Aus dem Pharmakologischen Institut der Universitätsklinik

und Poliklinik Würzburg

Direktor: Prof. Dr. med. Ulrich Trendelenburg

Kinetik der Aufnahme von ^{3}H-(±) Isoproterenol in das Drüsengewebe der Glandula submandibularis der Ratte. Ein Beitrag zur Untersuchung der extraneuronalen Aufnahme von Catecholaminen

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Horst Major

aus Reinheim 5

Würzburg, den 25.1.1980

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universitätsklinik
und Poliklinik Würzburg

Direktor: Prof. Dr. med. Ulrich Trendelenburg

Kinetik der Aufnahme von ^{3}H-(±) Isoproterenol in das Drüsengewebe der Glandula submandibularis der Ratte. Ein Beitrag zur Untersuchung der extraneuronalen Aufnahme von Catecholaminen

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Horst Major

aus Reinheim 5

Würzburg, den 25.1.1980

Referent: PD Dr. med. K.-H. Graefe

Korreferent: Prof. Dr. med. U. Trendelenburg

Dekan: Prof. Dr. med. K.-H. Wulf

Tag der mündlichen Prüfung: 31.7.1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Würzburg

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung

B. Methodik

1) Versuchstiere

2) Inkubationsversuche

3) Bestimmung der zellulären ^{3}H-Isoproterenol-Aufnahme

4) Messung der Radioaktivität

5) Mathematische Auswertung und Statistik

6) Verwendete Substanzen

C. Ergebnisse

1) Kinetik der Verteilung von ^{14}C-Sorbit und ^{3}H-Isoproterenol im Gewebe.

2) Einfluß von Hemmstoffen der extraneuralen Aufnahme auf die Verteilung von ^{3}H-Isoproterenol.

3) Einfluß einer veränderten Ionenzusammensetzung der Inkubationslösung.

4) Sättigungskinetik der initialen Aufnahme von ^{3}H-Isoproterenol.

D. Diskussion

E. Zusammenfassung

F. Literaturverzeichnis

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543520_0129

A. Einleitung

Das Catecholamin Noradrenalin ist der Überträgerstoff des sympathischen Nervensystems. Außerdem werden die Catecholamine Adrenalin und Noradrenalin im Nebennierenmark direkt in die Blutbahn abgegeben und wirken als Hormone auf alle mit Noradrenalin-Rezeptoren ausgestatteten Zellen. Durch die tonische Aktivität noradrenerger Neurone (z.B. im Herzen oder den arteriellen Gefäßen) wird der Neurotransmitter Noradrenalin ständig aus den sympathischen Nervenenden in den synaptischen Spalt freigesetzt. Dieses so freigesetzte Noradrenalin muß sehr rasch inaktiviert werden, um schnelle Regulationsvorgänge zu ermöglichen. Ein wichtiger Mechanismus, der diese Inaktivierung bewerkstelligt, ist die Aufnahme des Noradrenalins in die Varikositäten der sympathischen Nervenenden. Diesen Aufnahmeprozess hat Iversen 1963 beschrieben und 1965 $Uptake_1$ genannt. Es ist ein Na^+-abhängiger, temperaturempfindlicher und sättigungsfähiger Membran-Transportprozess, der erhebliche Konzentrationsgradienten zu generieren vermag. Er kann durch Pharmaka wie Cocain, Metaraminol und Desipramin spezifisch gehemmt werden (Iversen 1967).

Zusätzlich besteht ein zweiter Aufnahmeprozess, $Uptake_2$, den Iversen 1965 an isoliert perfundierten Rattenherzen entdeckte und dessen funktionelle Bedeutung auch heute noch umstritten ist. Zuerst sah man diesen Aufnahmeprozess ebenfalls als neuronal an (Iversen 1965), doch bald zeigten histochemische Untersuchungen, daß es sich hier um eine Aufnahme von Noradrenalin in extraneuronale Zellen oder Strukturen handelt (Ehinger und Sporrong 1968; Farnebo und Malmfors 1969). In der biochemischen Arbeit von Iversen (1965) und in den histochemischen

Arbeiten von Ehinger und Sporrong (1968) sowie Farnebo und Malmfors (1968) diente die Akkumulation des unveränderten Noradrenalins im Gewebe als Maß für die extraneuronale Aufnahme. Da eine Akkumulation von Noradrenalin in nicht-neuronalen Geweben (z.B. Herzmuskelzellen, glatte Gefäßmuskulatur) aber erst bei sehr hohen Aminkonzentrationen nachweisbar war, nahm man zunächst an, daß dieser Aufnahmeprozess erst bei hohen Substratkonzentrationen (d.h. erst nach Überschreiten einer bestimmten "Schwellenkonzentration") in Gang kommt. Diese Beobachtungen machten es sehr unwahrscheinlich, daß die extraneuronale Aufnahme bei niedrigen (physiologischen) Aminkonzentrationen eine wichtige Rolle bei der Transmitterinaktivierung spielt. Erst Lightman und Iversen (1969) und später Bönisch und Trendelenburg (1974) sowie Graefe et al. (1975) machten deutlich, daß die extraneuronale Aufnahme auch bei niedrigen Aminkonzentrationen zur Inaktivierung von Catecholaminen beiträgt; unter diesen Bedingungen (d.h. niedrige Aminkonzentration) wird nämlich das aufgenommene Amin von intrazellulär lokalisierten Enzymen (hauptsächlich von der Catechol-O-methyltransferase; COMT) zu Metaboliten abgebaut, so daß eine Akkumulation von unverändertem Noradrenalin in der Zelle nicht zustande kommen kann. Daraus ergibt sich eindeutig, daß beim Studium der extraneuronalen Aufnahme die intrazelluläre Akkumulation unveränderten Amins nur dann ein Maß für die aufgenommene Aminmenge darstellt, wenn die abbauenden Enzyme gehemmt oder gesättigt werden.

Die extraneuronale Aufnahme von Catecholaminen ist in der Zwischenzeit von vielen Autoren in den verschiedensten Organen unter in-vitro Bedingungen untersucht worden (Übersicht bei

Iversen, 1975). Dabei zeigte sich, daß eine solche Aufnahme in glatte Muskelzellen von Gefäßen, in Fibroblasten und in Herzmuskelzellen stattfindet. Diese Untersuchungen haben auch gezeigt, daß Catecholamine, die am Stickstoff der Seitenkette alkyliert sind, besonders gut extraneuronal aufgenommen werden. Zum Beispiel haben Untersuchungen von Hertting (1964) und Andén et.al.(1964) das N-Isopropylnoradrenalin (Isoproterenol) als gutes Substrat der extraneuronalen Aufnahme herausgestellt und wahrscheinlich machen können, daß dieses Amin neuronal praktisch nicht aufgenommen wird. Die extraneuronale Aufnahme unterscheidet sich von der neuronalen Aufnahme nicht nur hinsichtlich ihrer Substratspezifität, sondern auch hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber Hemmstoffen. Gute Hemmstoffe der extraneuronalen Aufnahme sind O-methylierte Catecholamine (Iversen,1967) und Corticosteroide (Iversen und Salt, 1970). Beide Stoffgruppen haben nur eine sehr geringe Affinität zur neuronalen Aufnahme. Andererseits haben die oben erwähnten Inhibitoren der neuronalen Aufnahme (Cocain, Desipramin, Metaraminol) keinen Einfluß auf die extraneuronale Aufnahme. Die die alpha-Rezeptoren blockierende Substanz, Phenoxybenzamin, hemmt sowohl die neuronale als auch die extraneuronale Aufnahme (Iversen, 1967).

Neben den bereits erwähnten Geweben mesenchymaler Herkunft (d.h. Herzmuskulatur, glatte Muskulatur) ist auch das Drüsengewebe von Speicheldrüsen zur Aufnahme von Catecholaminen befähigt. Eine Aufnahme von Noradrenalin in das Drüsengewebe der Glandula submandibularis der Ratte wurde erstmals von Andén et al. (1963) beschrieben und später durch histochemische Untersuchungen von Hamberger et al. (1967) bestätigt.

Dieser Aufnahmeprozess hat Eigenschaften, die in vieler Hinsicht denen der extraneuronalen Aufnahme sehr ähnlich sind (Übersicht bei Almgren und Jonason, 1976). Es war deshalb von Interesse, die Kinetik der extraneuronalen Aufnahme an diesem Organ zu studieren. Dies ist in der vorliegenden Arbeit geschehen. Als Substrat für die Aufnahme in das Drüsengewebe wurde ^{3}H-(±) Isoproterenol verwendet, wobei dünne Gewebsscheibchen der Submandibulardrüse der Ratte mit diesem Amin inkubiert wurden. Um die sättigungskinetischen Konstanten der glandulären Aminaufnahme zu bestimmen, wurden initiale Geschwindigkeiten für die ^{3}H-Isoproterenolaufnahme über einen großen Konzentrationsbereich gemessen und der Einfluß verschiedener Hemmstoffe der extraneuronalen Aufnahme untersucht. Die Versuchsergebnisse zeigen, daß die Aufnahme von Catecholaminen in das Drüsengewebe der Ratte sich auch hinsichtlich ihrer kinetischen Eigenschaften nicht von der extraneuronalen Aufnahme unterscheidet, die für glatte Muskelzellen oder Herzmuskelgewebe beschrieben wurde.

B. Methodik

1) Versuchstiere und Präparation

Als Versuchstiere wurden männliche Wistar-Ratten von 18o-25o g (mittleres Gewicht 2oo g) verwendet. Die Tiere wurden vor Versuchsbeginn durch einen Schlag auf den Kopf betäubt und durch Dislokation der Halswirbelsäule getötet. Sofort nach dem Tod der Tiere wurden die Speicheldrüsen (Glandulae submandibulares) herauspräpariert, sorgfältig von Kapselgewebe befreit und in kalte Krebs' Lösung überführt, die mit Carbogen (95% O_2 + 5% CO_2) durchströmt wurde. Zur weiteren Verarbeitung wurden die Speicheldrüsen mit Hilfe eines Stadie-Riggs Mikrotoms so zerteilt, daß von jeder Speicheldrüse 4 - 6 Gewebsscheibchen von ca o.5 mm Dicke und ca 15- 3o mg Gewicht entstanden. Jedes Scheibchen wurde mit dünnem Baumwollgarn an der Spitze eines Plastikstäbchens befestigt und bis zur Inkubation weiter in kalter Krebs' Lösung aufbewahrt, die mit Carbogen gesättigt war.

Die verwendete Krebs' Lösung hatte folgende Zusammensetzung (in mM): NaCl 118, KCl 4.7, CaCl 1.9, KH_2PO_4 1.2, $MgSO_4$ 1.2, $NaHCO_2$ 25, D-Glucose 5, Na_2EDTA o.o4, Ascorbinsäure o.57. Der Zusatz von EDTA und Ascorbinsäure war erforderlich, um die durch Schwermetallspuren katalysierte Oxydation von Isoproterenol zu verhindern.

Außerdem wurde der Krebs' Lösung stets ein Hemmstoff der COMT zugesetzt, um den enzymatischen Abbau von Isoproterenol zu unterbinden (s. Einleitung). Als COMT Hemmstoff wurde 3', 4'- Dihydroxy-2-methylpropiophenon (U-o521; Giles und Miller, 1967) verwendet, und zwar in einer Konzentration von

1oo µM. In getrennten Versuchen konnte gezeigt werden, daß diese U-o521 Konzentrationen die O-Methylierung von o.2 µM ^{3}H-Isoproterenol in der Speicheldrüse um mehr als 97% hemmen (Major et al., 1978). Da Isoproterenol kein Substrat der Monoaminoxydase (MAO) darstellt, brauchte dieses zweite wichtige Enzym des Catecholaminabbaus nicht gehemmt werden.

Der pH der mit 95% O_2 und 5% CO_2 durchperlten Krebs' Lösung wurde stets auf 7.4 eingestellt.

In einigen wenigen Versuchen war es erforderlich den endogenen Noradrenalingehalt der Speicheldrüsen drastisch zu senken. Zu diesem Zwecke wurden die Tiere mit Reserpin vorbehandelt. Sie erhielten jeweils zwei Reserpininjektionen s.c., 5mg/kg 2o Std. vor dem Versuch und 2.5 mg/kg 3 Std. vor dem Versuch.

2) Inkubationsversuche

Alle Gewebsscheibchen wurden bei 37 ^{o} C in Zentrifugengläschen inkubiert, die 4 ml Krebs' Lösung enthielten. Vom Boden der Gläschen aus wurde das Inkubationsmedium kräftig mit dem Gemisch aus O_2(95%) und CO_2(5%) durchperlt. Nach einer 3o min dauernden Vorinkubation, die der Anpassung des Gewebes an die in-vitro Bedingungen diente, wurden die Gewebsstückchen in das Testmedium überführt, das 1 µCi/ml ^{3}H-Isoproterenol (spezifische Aktivität: 4.9 - 6.4 Ci/mMol) sowie verschiedene Konzentrationen nichtmarkierten ($\pm$) Isoproterenols enthielten. Die Endkonzentrationen des Isoproterenols lagen in den verschiedenen Versuchen zwischen o.2

und 6oo µM. Neben dem ^{3}H-Isoproterenol enthielt das Testmedium o.2 µCi/ml ^{14}C-Sorbit (spezifische Aktivität: 2oo mCi/mMol) sowie 49 nMol/ml nicht-markiertes Sorbit. Letzteres diente der Einstellung einer in allen Versuchen gleichbleibenden Sorbitkonzentration von 5o µM. Der Zusatz von ^{14}C-Sorbit im Testmedium hatte zum Ziel, durch Bestimmung des ^{14}C-Gehaltes der Gewebe den Sorbit-Verteilungsraum und damit den Extrazellulärraum (Morgan et al.,1961; Iversen, 1965) jedes einzelnen Gewebestückchens zu messen (siehe unten).

Die Dauer der Inkubation mit dem Testmedium betrug in der ersten Serie von Versuchen, in denen der Zeitverlauf auf Isoproterenol-Aufnahme untersucht wurde, o.5 bis 6o Minuten. In einer zweiten Versuchsserie wurden zur Bestimmung der initialen Aufnahmegeschwindigkeit von Isoproterenol jeweils zwei benachbarte Gewebsstückchen mit der gleichen Isoproterenol-Konzentration inkubiert, und zwar für o.75 und 1.5 Minuten. Aus der Aminaufnahme beider Gewebsproben und der Inkubationszeit wurde dann die initiale Aufnahmegeschwindigkeit (in nMol $\cdot$ g^{-1} $\cdot$ min^{-1}) berechnet.

Um den Einfluß von Hemmstoffen der extraneuronalen Aufnahme zu untersuchen, enthielt das Testmedium in einigen Versuchen 3o µM Phenoxybenzamin, Corticosteron oder Normetanephrin (Iversen 1965; Iversen und Salt, 197o). Die Gewebsproben wurden in diesen Versuchen nicht nur während der Inkubation mit dem Testmedium, sondern auch während der 2. Hälfte der Vorinkubation (d.h. schon 15 Minuten vorher) den Hemmstoffen ausgesetzt. Stammlösungen der Hemmstoffe wurden für jeden Versuch frisch hergestellt und die Hemmstoffkonzentration

in den Stammlösungeen wurde so bemessen, daß der Zusatz zum Inkubationsmedium o.1% des Inkubationsbades nicht überstieg. Normetanephrin wurde in aqua bidest. gelöst, während die Stammlösungen für Corticosteron und Phenoxybenzamin unter Verwendung von absolutem Äthanol hergestellt wurden. Die Endkonzentration von Äthanol im Inkubationsbad betrug 17 mM. Es ist bekannt, daß diese Äthanolkonzentration keinen Einfluß auf die extraneuronale Aufnahme und Metabolisierung von Catecholaminen hat (Graefe und Trendelenburg, 1974; Major et al.,1978). Auch in den vorliegenden Untersuchungen hatte 17 mM Äthanol keinen hemmenden Einfluß auf die Aufnahme von Isoproterenol in das Drüsengewebe der Ratte.

In einigen Versuchen wurde die Ionenzusammensetzung der Krebs' Lösung verändert. Und zwar wurde eine Krebs' Lösung verwendet, deren Na^+-Konzentration von 143 mM auf 25 mM herabgesetzt wurde. In diesen Versuchen wurde 118 mM NaCl isomolar entweder durch TrisHCl (pH 7.4) oder KCL ersetzt, d.h. die Na^+-Konzentration wurde entweder ohne oder mit gleichzeitiger Veränderung der K^+-Konzentration herabgesetzt. Zur Herstellung einer Ca-freien Krebs' Lösung wurde $CaCl_2$ ohne Ersatz weggelassen und der Lösung 1 mM EGTA (mit Tris-Base gepuffert) zugesetzt. In all den Versuchen, in denen Gewebsproben mit einer Krebs' Lösung veränderter Ionenzusammensetzung inkubiert wurden, geschah dies nicht nur während der Inkubation mit dem Testmedium, sondern auch während der letzten 15 Minuten der Vorinkubation.

Am Ende der Inkubation mit dem Testmedium wurde das Gewebe für 1o sec in eiskalte Krebs' Lösung überführt und gespült. Durch diese Maßnahme wird die extraneuronale Aufnahme von

Catecholaminen abrupt gestoppt (Trendelenburg und Henseling 1976; Major et al.,1978) und die an der Gewebsoberfläche haftende Radioaktivität abgespült. Anschließend wurde das Gewebe von den Plastikstäbchen entfernt, kräftig zwischen 2 Blättern von Filterpapier getrocknet und gewogen. Das Gewebe wurde dann in Zählfläschchen überführt und in o.5 M Soluene 3oo^{R} (Packard Instruments) über Nacht bei 4o^{o} C solubilisiert. Außerdem wurden nach Beendigung der Inkubation zur Messung der Radioaktivität im Testmedium 2 Proben zu je o.1 ml des Testmediums in Zählfläschchen pipettiert.

3) Bestimmung der zellulären ^{3}H-Isoproterenol-Aufnahme

Der ^{3}H-Gehalt des Gewebes ist nach Hemmung der COMT ein Maß für die Aufnahme von ^{3}H-Isoproterenol in das Gewebe (Bönisch und Trendelenburg,1974). Aus dem ^{3}H- und dem ^{14}C-Gehalt des Gewebes und des Inkubationsbades am Ende der Inkubation wurde der Verteilungsraum (VR; in ml $\cdot$ g^{-1}) für Isoproterenol und Sorbit nach folgender Formel berechnet:

$$VR = \frac{\text{dpm/g Gewebe}}{\text{dpm/ml Bad}}$$

Der Sorbit-Verteilungsraum wurde als Maß für den Extrazellulärraum angesehen und es wurde die Annahme gemacht, daß die Sorbitverteilung im Gewebe die extrazelluläre Verteilung des Isoproterenols widerspiegelt. Auf diese Weise konnte die Aminaufnahme mit der extrazellulären Aminverteilung korrigiert werden. Nach Subtraktion des ^{14}C-Verteilungsraumes vom totalen ^{3}H-Verteilungsraum ergab sich der "intrazelluläre" Aminverteilungsraum (bzw. die zelluläre Aminaufnahme), der dann mit der Aminkonzentration (μM) im Inkubationsbad

multipliziert wurde, um die Aminaufnahme in $\mu Mol \cdot g^{-1}$ zu erhalten.

4) Messung der Radioaktivität

Der ^{3}H- und ^{14}C-Gehalt der Inkubationsbäder und Gewebsproben wurde in einem Flüssigkeitsszintillationszähler der Fa. Packard Instruments (Packard Tricarb, Modell 339o/544) gemessen. Zu den Proben wurden 8 - 1o ml eines Szintillationscocktails folgender Zusammensetzung zugesetzt (Angaben pro 1.o2 Liter): 5.o g 2,5-Diphenyloxazol (PPO); o.1 g Dimethyl-1, 4-bis2-(4-Methyl-5-Phenyloxazol)-Benzol; 6oo ml Toluol; 3oo ml Triton X 1oo; 1oo ml Äthanol 98%-ig und 2o ml 1 N HCl (Graefe et al.,1973). Die gezählten Impulse pro min (cpm) wurden mit Hilfe des AES (Automatic External Stan - dardisation)- Quotienten und einer Quenchkurve (Zählausbeute als Funktion des AES-Quotienten) zu absoluten Zerfallraten (dpm) hochgerechnet. Zur Simultanmessung von ^{3}H und ^{14}C wurde die vom Hersteller (Packard Instruments) empfohlene 2-Kanal-Methode verwendet, die eine Korrektur der im ^{3}H-Kanal nachweisbaren ^{14}C-Zerfälle ermöglichte. Die Einstellung der Kanäle des Gerätes wurde so gewählt, daß von den niederenergetischen ^{3}H-Zerfällen weniger als o.o1% im ^{14}C-Kanal nachweisbar waren, so daß für die ^{14}C-Zerfälle auf die oben erwähnte Korrektur verzichtet werden konnte. Die Zählausbeute für ^{3}H betrug 2o - 25%, die für ^{14}C (in Gegenwart von ^{3}H) 45 - 5o%.

5) Mathematische Auswertung und Statistik

Die in der vorliegenden Arbeit angegebenen Mittelwerte sind arithmetische Mittelwerte ($\bar{x}$) mit den zugehörigen mittleren

Fehlern der Mittelwerte ($S_{\bar{x}}$). Unterschiede zwischen Mittelwerten wurden mit dem t-Test nach Student oder mit dem gepaarten t-Test geprüft. Unterschiede wurden als signifikant angesehen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5% war (d.h. $P < 0.05$). Regressions- und Korrelationsanalysen wurden unter Berücksichtigung der in der Statistik üblichen Methoden durchgeführt (Fisher, 1958). Für den statistischen Vergleich von Kurvenverläufen wurde die Varianzanalyse von Winne (1965) herangezogen.
Die Sättigungsfunktion der Isoproterenol-Aufnahme (d.h. die initiale Aufnahmegeschwindigkeit als Funktion der Isoproterenol-Konzentration im Inkubationsbad) wurde nach der Methode von Wilkinson (1961) ausgewertet. Dabei werden die experimentellen Daten mit Hilfe eines iterativen Verfahrens durch Minimalisierung der quadratischen Abweichung direkt an die Michaelis-Menten-Gleichung angepasst:

$$v_i = \frac{V_{max} \cdot S}{K_m + S}$$

(v_i = initiale Aufnahmerate; S = Substratkonzentration; V_{max} = maximale Aufnahmegeschwindigkeit; K_m = Halbsättigungskonstante, d.h. die Substratkonzentration bei der $v_i = V_{max}/2$). Die Analyse nach Wilkinson (1961) liefert K_m - und V_{max} -Werte mit den zugehörigen $S_{\bar{x}}$ -Werten.
Der Zeitverlauf der Verteilung von Sorbit und Isoproterenol im Drüsengewebe (letzterer nach Korrektur mit dem Sorbit-Verteilungsraum) wurde als eine Verteilungskinetik 1. Ordnung aufgefasst und kann durch folgende Gleichung beschrie-

ben werden:

$$VR_t = VR_e(1-e^{-kt})$$

(wobei VR_t = Verteilungsraum zum Zeitpunkt t, VR_e = Verteilungsraum im Fliessgleichgewicht der Verteilung und k = Geschwindigkeitskonstante 1. Ordnung, mit der das Verteilungsgleichgewicht angestrebt wird).

Da die Inkubationsdauer nicht lang genug war um den Verteilungsraum im Fliessgleichgewicht exakt bestimmen zu können, mußte sowohl VR_e als auch k mit Hilfe einer semi-logarithmischen Auftragung der Aufnahmerate (v; in $ml \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$) gegen die Zeit ermittelt werden. Dabei wurde die Zunahme von VR von einem Zeitpunkt (t_1) zum nächsten Zeitpunkt (t_2) verwendet, um v mit Hilfe des Quotienten $\Delta VR/\Delta t$ zu berechnen (wobei $\Delta VR = VR_{t2}-VR_{t1}$ und $\Delta t = t_2-t_1$). Im Falle einer einfachen linearen Beziehung mit negativer Steigung zwischen dem Logarithmus von v und der Zeit läßt sich einerseits (durch Extrapolation gegen den Zeitpunkt t_o) die initiale Aufnahmerate (v_i) und andererseits die Steigung (k') ermitteln; k ergibt sich dann aus $k = \ln 1o \cdot k'$ und VR_e aus $VR_e = v_i/k$.

Da die Verteilungsgeschwindigkeit des Sorbits und des Isoproterenols gemäß einer zusammengesetzten Exponentialfunktion biphasisch-exponentiell mit der Zeit abnahm (ein Befund, der eine Verteilung in zwei Verteilungsräume widerspiegelt), wurden diese Kurven mit Hilfe der Abschältechnik (Riggs,1963) in ihre linearen Einzelkomponenten zerlegt. In ähnlicher Weise wurde von Iversen (1963) die Kinetik der Verteilung von Noradrenalin im perfundierten Rattenherz analysiert.

6) Verwendete Substanzen

Corticosteron (Fluka AG);

3',4'-Dihydroxy-2-methylpropiophenon (U-o521; Upjohn Company);

Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA;Merck AG);

3,6-Dioxaoctamethylendinitrilotetraessigsäure (EGTA;Merck AG);

(±) Isoproterenol-7-^{3}H(N) (4.9-6.3 Ci/mMol; NEN Chemicals);

(±) Isoproterenolhydrochlorid (Serva);

(±) Normetanephrinhydrochlorid (Smith, Kline und French);

Reserpin (Serpasil^{R}; Ciba-Geigy);

D-Sorbit-^{14}C(U) (2oo mCi/mMol; NEN-Chemicals);

D-Sorbit (Merck AG);

C. Ergebnisse

1) Kinetik der Verteilung von ^{14}C-Sorbit und ^{3}H-Isoproterenol im Drüsengewebe

Die Aufnahme und Verteilung von ^{3}H-Isoproterenol in der Submandibulardrüse der Ratte wurde in der vorliegenden Arbeit unter in-vitro Bedingungen gemessen. Zu diesem Zweck wurden Gewebsproben der Drüse mit verschiedenen Konzentrationen von ^{3}H-Isoproterenol inkubiert und die sich im Gewebe akkumulierende Radioaktivität (^{3}H) gemessen. Da die Versuche stets in Gegenwart eines Hemmstoffes der COMT (1oo µM U-o521) durchgeführt wurden, ist die Annahme gerechtfertigt, daß die Akkumulation von Radioaktivität im Gewebe die Aminaufnahme widerspiegelt. Um die im Extrazellulärraum verteilte Aminmenge von der Gesamtaufnahme subtrahieren zu können, wurde in jeder einzelnen Gewebsprobe der Extrazellulärraum mit ^{14}C-Sorbit mitbestimmt, d.h. die Inkubationsbäder enthielten

stets auch ^{14}C-Sorbit. Auf diese Weise ist es möglich, die zelluläre Aufnahme von ^{3}H-Isoproterenol (Gesamtaufnahme minus Extrazellulärraum) zu bestimmen.

Die Verteilung von ^{14}C-Sorbit im Drüsengewebe wurde durch Isoproterenol nicht beeinflußt und war unabhängig von der verwendeten Isoproterenolkonzentration im Inkubationsmedium. Der Zeitverlauf der Verteilung von ^{14}C-Sorbit ist in Abb.1 dargestellt. Bis zur zwanzigsten Minute ließ sich diese Kurve als eine biphasische Exponentialfunktion beschreiben, wonach sich ^{14}C-Sorbit in zwei voneinander unabhängigen Räumen im Gewebe verteilt: einem schnell-äquilibrierenden und einem langsam äquilibrierenden Raum. Die mathematische Analyse derartiger Exponentialfunktionen ist in der Methodik ausführlich beschrieben.

Der graphische Teil ist im Nebenbild der Abb.1 gezeigt. Aus der hier dargestellten biphasischen Exponentialfunktion konnten die Größen der Verteilungsräume (VR_e) und die Geschwindigkeitskonstanten (k), mit denen diese Räume einem Verteilungsgleichgewicht zustreben, ermittelt werden. Der schnell-äquilibrierende Verteilungsraum hatte eine Größe von o.o54 ml $\cdot$ g^{-1} und einen k-Wert von 2.5 min^{-1} (entsprechend einer Halbwertzeit für die Äquilibration von o.3 min), während der langsam-äquilibrierende Verteilungsraum (VR_e = o.256 ml $\cdot$ g^{-1}) mit einem k-Wert von o.14 min^{-1} (Halbwertszeit = 4.9 min) dem Verteilungsgleichgewicht zustrebte. Demnach hätte der ^{14}C-Sorbit-Raum insgesamt eine Größe von o.31o ml $\cdot$ g^{-1}. Diese Größe des Extrazellulärraumes stimmt recht gut mit der Größe des Extrazellulärraumes anderer Drü-

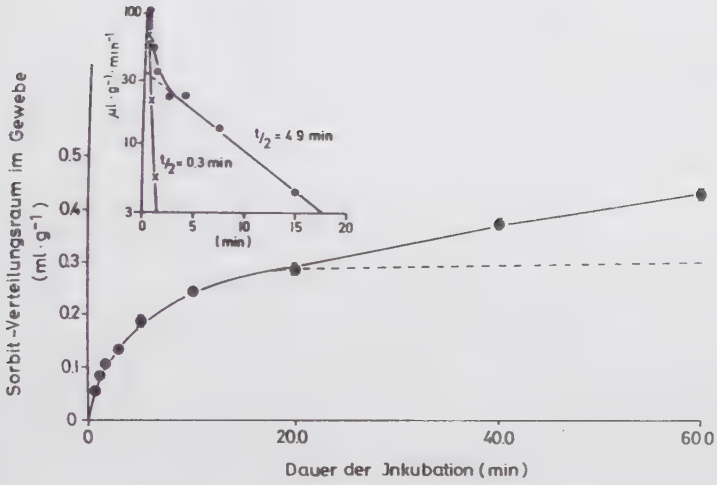

Abb.1

Verteilung von ^{14}C-Sorbit in Gewebsproben der Submandibulardrüse der Ratte; Krebs' Lösung; 37°C. Ordinate: ^{14}C-Sorbit Verteilungsraum im Gewebe ($ml \cdot g^{-1}$). Abszisse: Dauer der Inkubation (min). Bis zu 1o Gewebsproben einer Speicheldrüse wurden in parallelen Inkubationsansätzen für die Dauer von o.5 bis 6o min mit 5o µM ^{14}C-Sorbit inkubiert. Aus der Sorbitkonzentration im Inkubationsbad (am Ende der Inkubation) und dem Sorbitgehalt des Gewebes wurde der Sorbit-Verteilungsraum im Gewebe berechnet. Gezeigt sind Mittelwerte $\pm S_{\bar{x}}$ aus jeweils 26 Versuchen. Das Nebenbild zeigt eine kinetische

sengewebes überein (Leslie et al., 1976; Parod und Putney 1978). Die Beobachtung, daß sich ^{14}C-Sorbit in 2 unterschiedlich schnell äquilibrierenden extrazellulären Räumen verteilt, wurde auch in anderen Geweben gemacht (perfundiertes Rattenherz: Morgan et al.,1961; Hirngewebe: Cohen et al., 197o; Nickhaut der Katze: Graefe und Trendelenburg, 1974). Der Zeitverlauf der ^{14}C-Sorbit-Verteilung in Abb.1 zeigt, daß der Verteilungsraum für ^{14}C-Sorbit nach der zwanzigsten Minute weiter langsam zunahm. Dieses Geschehen wurde in der oben besprochenen Analyse nicht berücksichtigt, da die Aufnahmegeschwindigkeit für ^{14}C-Sorbit nach der zwanzigsten Minute wieder zunahm. Diese Phänomen kann dahingehend interpretiert werden, daß ^{14}C-Sorbit doch langsam zellulär aufgenommen wird. Ähnliche Befunde sind auch für andere

---

Analyse des Zeitverlaufes der Sorbitverteilung für die ersten 2o min der Inkubation (Ordinate: Verteilungsgeschwindigkeit in $ml \cdot g^{-1}$; logarithmische Skala. Abszisse: Inkubationsdauer in min). Zur Berechnung der Verteilungsgeschwindigkeit s. Methodik. Die Orginalwerte (·—·) zeigen zwischen der 2.5. und der 2o.min einen monophasisch-exponentiellen Abfall der Geschwindigkeit mit der Zeit (langsam-äquilibrierender Raum); nach Subtraktion dieser späten linearen Komponente von den Orginalwerten wurden Geschwindigkeiten erhalten (x-x), die den Einstrom von Sorbit in einem schnell-äquilibrierenden Verteilungsraum widerspiegeln. Die Halbwertzeiten (t/2) wurden aus den negativen Steigungen der dargestellten Geraden berechnet(t/2 = log o.5/ Steigung).

Stoffe erhoben wurden, die zur Bestimmung des Extrazellulärraumes verwendet werden (Brading und Jones, 1969; Leslie et al., 1976).

Der Zeitverlauf der intrazellulären Verteilung von ^{3}H-Isoproterenol wurde für zwei Aminkonzentrationen (o.2 und 2oo µM) über 6o Minuten verfolgt. Wie aus Abb. 2a hervorgeht, waren die zu den verschiedenen Zeitpunkten bestimmten Verteilungsräume bei beiden Aminkonzentrationen praktisch gleich groß; beide Kurven unterschieden sich varianzanalytisch nicht voneinander (Varianzanalyse nach Winne, 1965 $F_{1o,16o}$=o.579). Da sich die Konzentrationen von ^{3}H-Isoproterenol im Inkubationsbad auch während einer Inkubation von 6o Minuten nur unwesentlich änderten, während einer 6o-min Inkubation mit o.2 µM ^{3}H-Isoproterenol nahm die Aminkonzentration im Bad um 2.6% (n=9) ab, konnte auch der Zeitverlauf der ^{3}H-Isoproterenol-Aufnahme verteilungskinetisch analysiert werden. Für die Analyse wurden die für beide Aminkonzentrationen erhaltenen Ergebnisse der Abb. 2a gemittelt, die Aufnahme- bzw. Verteilungsgeschwindigkeiten berechnet (siehe Methodik) und im halblogarithmischen Raster gegen die Zeit aufgetragen (Abb. 2b). Die zelluläre Verteilung von ^{3}H-Isoproterenol ließ sich mit der Summe zweier Exponentialfunktionen beschreiben, eine Beobachtung, die mit der Hypothese vereinbar ist, daß sich ^{3}H-Isoproterenol in zwei zelluläre Kompartimente verteilt. Aus den zwei Exponentialfunktionen, die in Abb. 2b gezeigt sind, wurde errechnet, daß sich das größere dieser Kompartimente (VR_e = 2.o4 ml · g^{-1}; k = o.o44 min^{-1}) mit einer Halbwertszeit von 15.8 min füllte, während das kleinere Komparti-

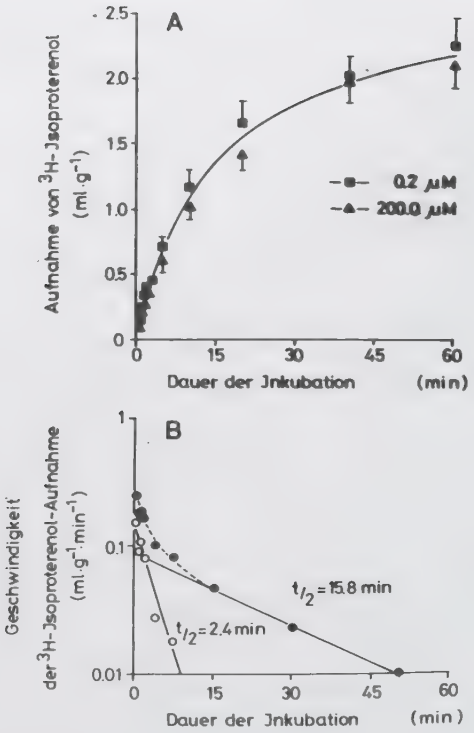

Abb. 2 a u. b

Verteilung von ^{3}H-Isoproterenol in Gewebsproben der Submandibulardrüse der Ratte; Krebs' Lösung; 37°C Ordinaten: A. Verteilungsraum von ^{3}H-Isoproterenol im Gewebe (ml · g^{-1}); B. Verteilungsgeschwindigkeit (ml · g^{-1} · min^{-1}); logarithmische Skala. Abszissen: Inkubationsdauer (min). Bis zu 1o Gewebsproben einer Speicheldrüse wurden in parallelen Inkubationsansätzen für o.5 bis 6o min mit 5o µM ^{14}C-Sorbit und o.2 oder 2oo µM ^{3}H-Isoproterenol inkubiert. Zur Hemmung der COMT enthielten die Inkubationsbäder außerdem o.1 mM U-o521. Der ^{14}C-Sorbit-Verteilungsraum im Gewebe (nicht gezeigt) wurde

ment (VR_e = o.45 ml · g^{-1}; k = o.29 min^{-1}) ein Verteilungsgleichgewicht mit einer Halbwertzeit von 2.4 min anstrebte. Eine Verteilung von ^{3}H-Isoproterenol in zwei zelluläre Kompartimente haben Bönisch und Trendelenburg (1974) an Hand von Effluxversuchen auch für das perfundierte Rattenherz beschrieben.

---

verwendet, um die Aufnahme von Isoproterenol mit der extrazellulären Aminverteilung zu korrigieren. a) Gezeigt sind Mittelwerte $\pm$ $S_{\bar{x}}$ aus jeweils 9 Versuchen. b.)Die für beide Aminkonzentrationen erhaltenen Ergebnisse wurden gemittelt und aus den gemittelten Ergebnissen Verteilungsgeschwindigkeiten berechnet (siehe Methodik). Die Orginalwerte (•-•) zeigen beginnend mit der 15. min der Inkubation einen monophasisch-exponentiellen Abfall der Verteilungsgeschwindigkeit mit der Zeit (langsam-äquilibrierender Verteilungsraum); nach Subtraktion dieser Komponente von den Orginalwerten ergab sich eine weitere exponentielle Komponente der Verteilung (o-o; schnell-äquilibrierender Verteilungsraum). Die gezeigten Halbwertzeiten (t/2) wurden aus den negativen Steigungen der dargestellten Geraden berechnet (t/2 = log o.5 / Steigung).

2) Einfluß von Hemmstoffen der extreneuronalen Aufnahme auf die Verteilung von ^{3}H-Isoproterenol .

In der folgenden Versuchsserie wurde der Zeitverlauf der Aufnahme von ^{3}H-Isoproterenol in Gegenwart von 3o µM Corticosteron (Abb.3) oder 3o µM Phenoxybenzamin (Abb.4) bestimmt. Die Konzentration von ^{3}H-Isoproterenol im Inkubationsmedium betrug bei diesen Versuchen o.2 µM. Aus Untersuchungen von Iversen (1965), sowie Iversen und Salt (197o) ist bekannt, daß Phenoxybenzamin und Corticosteron die extraneuronale Aufnahme von Catecholaminen in das perfundierte Rattenherz hemmen. Aus Abb. 3 und 4 geht eindeutig hervor, daß diese Hemmstoffe auch die Aufnahme von ^{3}H-Isoproterenol in die Speicheldrüse beeinträchtigten, wobei Phenoxybenzamin bei der verwendeten Konzentration die Aminaufnahme stärker zu hemmen schien als Corticosteron (vergleiche Abb.3 und 4). Da die inhibitorischen Effekte der Hemmstoffe während der frühen und der späten Phase des Zeitverlaufes etwa gleich stark (d.h. unabhängig von der Inkubationsdauer) waren, ist der Schluß gerechtfertigt, daß beide Hemmstoffe die Aufnahme und Verteilung von ^{3}H-Isoproterenol sowohl in das schnell-äquilibrierende, als auch in das langsam-äquilibrierende zelluläre Kompartiment hemmen.

3) Einfluß einer veränderten Ionenzusammensetzung der Inkubationslösung auf die Verteilung von ^{3}H-Isoproterenol

Es ist bekannt, daß die neuronale Aufnahme von einigen Transmitterstoffen (z.B. Aminen und Aminosäuren) von der Na^{+}-Konzentration in der extrazellulären Flüssigkeit abhängt

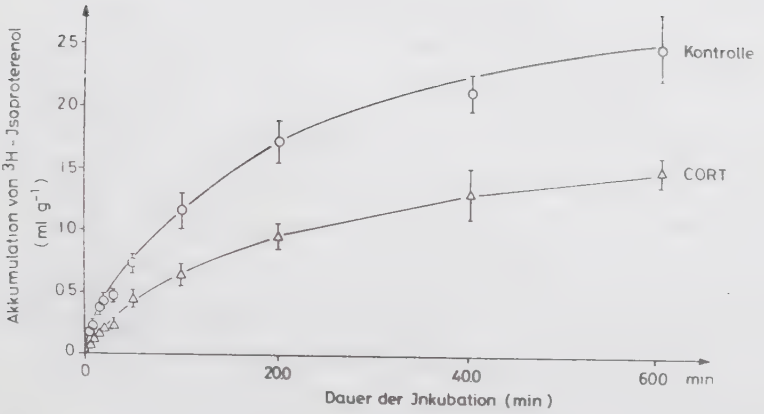

Abb.3

Einfluß von Corticosteron (CORT) auf die Aufnahme von ^{3}H-Isoproterenol in Gewebsproben der Submandibulardrüse der Ratte; Krebs' Lösung; 37°C. Ordinate: Aufnahme von ^{3}H-Isoproterenol in das Gewebe (in ml · g^{-1}). Abszisse: Inkubationsdauer (min). Gewebsproben von Speicheldrüsen wurden für o.5 bis 6o min mit 5o µM/ ^{14}C-Sorbit und o.2 µM ^{3}H-Isoproterenol in Gegenwart von o.1 mM U-o521) inkubiert. Das in das Gewebe aufgenommene ^{14}C-Sorbit diente zur Bestimmung des Extrazellulärraumes, so daß die extrazellulär verteilte Aminmenge in jeder einzelnen Gewebsprobe von der insgesamt aufgenommenen Aminmenge subtrahiert werden konnte. Die Gewebsproben einer Speicheldrüse wurden stets so gepaart, daß eine Hälfte mit

(Übersicht bei Iversen,1975), weshalb man bei diesen Membrantransportprozessen auch von einem "Na-abhängigen" Membrantransport spricht. Auch wenn die extraneuronale Aufnahme von Catecholaminen eine derartig eindeutige Abhängigkeit von der extrazellulären Na^+ -Konzentration nicht gefunden wurde, haben gleichwohl Gillespie und Towart (1973) berichtet, daß eine Erniedrigung der externen Na^+-Konzentration von 144 auf 25 mM die Akkumulation von Noradrenalin in glatten Muskelzellen um etwa 25 % vermindert. Um zu prüfen, ob eine solche partielle Hemmung der Aufnahme in Na^+-armen Lösungen auch an der Speicheldrüse nachweisbar ist, wurde der Zeitverlauf der ^{3}H-Isoproterenol-Aufnahme in einem Inkubationsmedium gemessen, in dem 118 mM NaCl durch 118 mM Tris-HCl ersetzt wurden (Endkonzentration der Na^+ : 25 mM; ^{3}H-Isoproterenol-Konzentration: o.2 µM). Ein Vergleich mit der Aufnahmekurve, die unter Kontrollbedingungen bestimmt wurde, ergab, daß die Erniedrigung der Na^+-Konzentration auf 25 mM praktisch keinen Einfluß auf die Aufnahme von ^{3}-H Isoproterenol hatte (Abb.5).

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die K^+ Konzentration in der Inkubationslösung von 5.9 auf 123.9 mM erhöht. In dieser Lösung wurden 118 mM NaCl durch 118 mM KCl ersetzt.

---

und die andere Hälfte ohne Corticosteron (3o µM) inkubiert wurde. Gezeigt sind Mittelwerte $\pm S_{\bar{x}}$ aus 9 (Kontrolle), bzw. 4 (CORT) Versuchen.

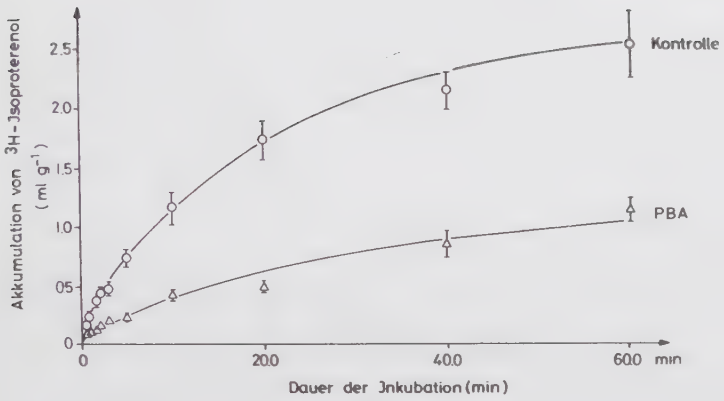

Abb. 4

Einfluß von Phenoxybenzamin (PBA) auf die Aufnahme von ^{3}H-Isoproterenol in Gewebsproben der Submandibulardrüse der Ratte; Krebs' Lösung; 37°C. Ordinate: Aufnahme von ^{3}H-Isoproterenol in das Gewebe in ml · g^{-1} (korrigiert für die extrazelluläre Aminverteilung). Abszisse: Inkubationsdauer (min). Entsprechend dem Versuchsprotokoll, das in der Legende zur Abb.3 wiedergegeben ist, wurde in gepaarten Versuchen die Wirkung von 3o µM Phenoxybenzamin auf den Zeitverlauf der Aufnahme von ^{3}H-Isoproterenol untersucht. Gezeigt sind Mittelwerte $\pm S_{\bar{x}}$ aus 9 (Kontrollen), bzw. 4 (PBA) Versuchen.

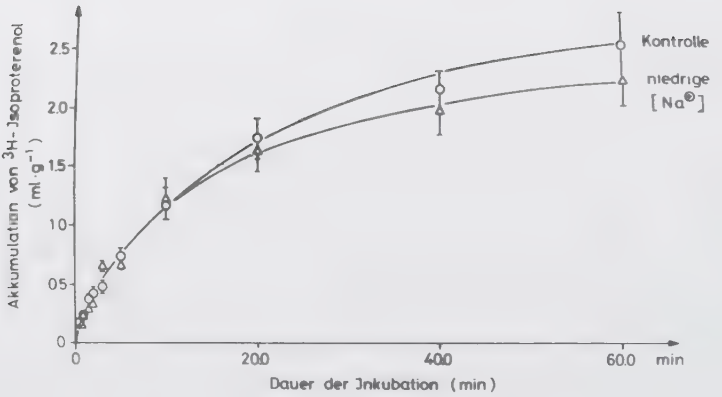

Abb. 5

Das Fehlen des Einflusses einer stark erniedrigten Na^+-Konzentration in der Inkubationslösung auf die Aufnahme von ^3H-Isoproterenol in Gewebsproben der Submandibulardrüse der Ratte; 37°C. Ordinate: Aufnahme von ^3H-Isoproterenol in das Gewebe in ml · g^{-1} (korrigiert für die extrazelluläre Aminverteilung). Abszisse: Inkubationsdauer (min). Entsprechend dem Versuchsprotokoll, das in der Legende zur Abb. 3 wiedergegeben ist, wurden in gepaarten Versuchen Gewebsproben entweder in normaler Krebs' Lösung inkubiert (Na^+-Konzentration = 143 mM) oder einer Krebs' Lösung ausgesetzt, deren Na^+-Konzentration auf 25 mM erniedrigt war (d.h. 118 mM NaCl wurden durch 118 mM TrisHCl, pH 7.4 ersetzt). Gezeigt sind Mittelwerte $\pm S_{\bar{x}}$ aus 9 (Kontrollen), bzw. 4 (niedrige Na^+-Konzentrationen) Versuchen.

Da die Wegnahme von 118 mM Na^+ keinen Einfluß auf die Aufnahme von ^{3}H-Isoproterenol hatte, konnte mit diesen Versuchen untersucht werden, ob eine Erhöhung der extrazellulären K^+-Konzentration die extraneuronale Aufnahme von ^{3}H-Isoproterenol beeinflußt oder nicht. Die Ergebnisse sind in Abb. 6 wiedergegeben und mit den Ergebnissen einer Kontrollgruppe verglichen. Auch in diesen Versuchen betrug die Konzentration von ^{3}H-Isoproterenol im Inkubationsbad o.2 µM. Die hohe K^+-Konzentration hatte einen deutlich hemmenden Einfluß auf die Aufnahme von ^{3}H-Isoproterenol. Sowohl initial, als auch spät im Zeitverlauf betrug die Hemmung der Aufnahme etwa 50%, d.h. hohe K^+-Konzentration hemmen die Aufnahme von ^{3}H-Isoproterenol sowohl in das schnell-äquilibrierende, als auch in das langsam-äquilibrierende Kompartiment. Aus der Literatur ist bekannt (Gillespie und Towart, 1973; Anning et al., 1978), daß die extraneuronale Akkumulation von Catecholaminen in glatte Muskelzellen durch hohe K^+-Konzentrationen gehemmt werden kann. Die in den hier beschriebenen Versuchen verwendete K^+-Konzentration (123.9 mM) ist sehr hoch. Man kann wohl mit recht annehmen, daß diese K^+-Konzentration nicht nur die Zellmembranen der Drüsenzellen, sondern auch die axonale Membran sympathischer Nervenendigungen depolarisiert, d.h. das Ruhepotential dieser Zellen erheblich vermindert. Da depolarisierende K^+-Konzentrationen endogenes Noradrenalin aus den adrenergen Nervenendigungen freisetzt (Kirpekar und Wakade, 1968; Haeusler et al., 1968), muß die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß das freigesetzte Noradrenalin die extra-

neuronale Aufnahme von ^{3}H-Isoproterenol kompetitiv hemmt. Diese Möglichkeit muß auch deshalb ventiliert werden, weil die Aufnahme von ^{3}H-Isoproterenol mit steigenden Aminkonzentrationen gesättigt werden kann (siehe nächsten Abschnitt). Wenn also als Folge der Transmitterfreisetzung genügend hohe Noradrenalin-Konzentrationen in der extrazellulären Flüssigkeit aufgebaut werden, wäre es denkbar, daß die in Abb. 6 gezeigte Aufnahmehemmung durch eine Konkurrenz zwischen Noradrenalin und ^{3}H-Isoproterenol an der Aufnahmestelle zustande kommt. Um diese Möglichkeit auszuschließen wurde die Aufnahme von ^{3}H-Isoproterenol (0.2 µM; 1-min Inkubation) unter Bedingungen gemessen, unter denen eine Freisetzung von endogenem Noradrenalin nicht möglich ist (Abb. 7). In einer Versuchsgruppe wurden die endogenen Noradrenalinspeicher durch Vorbehandlung der Tiere mit Reserpin (siehe Methodik) entleert und in einer weiteren Gruppe von Versuchen wurde die Freisetzung von endogenem Noradrenalin dadurch verhindert, daß die Versuche in Ca^{++}-freier Krebs' Lösung (die zusätzlich 1 mM EGTA enthielt, um noch vorhandene Ca^{++} abzufangen) durchgeführt wurden. Es ist nämlich bekannt, daß es bei der durch Depolarisation der Nervenendigungen bedingten Freisetzung von Noradrenalin der Anwesenheit extrazellulärer Ca^{++} bedarf (Kirpekar und Wakade, 1968; Haeusler et al., 1968). Abb. 7 illustriert, daß die hemmende Wirkung depolarisierender K^{+}-Konzentrationen auf die Aufnahme von ^{3}H-Isoproterenol auch unter diesen Bedingungen voll nachweisbar war. Die Hypothese, daß die Hemmung der Aufnahme in K^{+}-reichen Lösungen durch eine Freisetzung endogenen Noradrenalins

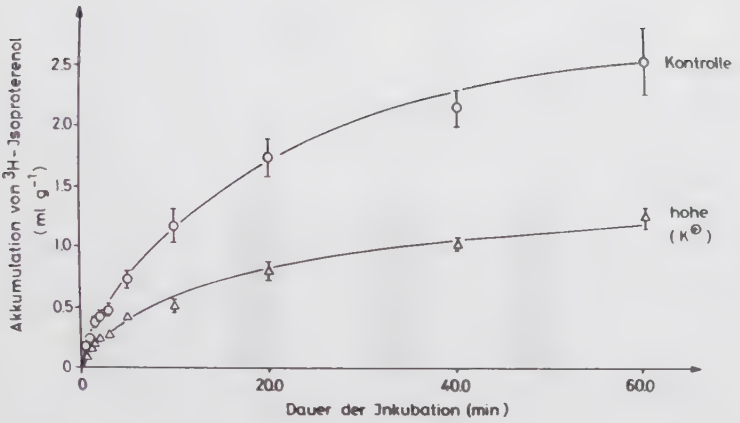

Abb. 6

Einfluß einer depolarisierenden K^+-Konzentration in der Inkubationslösung auf die Aufnahme von ^{3}H-Isoproterenol in Gewebsproben der Submandibulardrüse der Ratte; 37°C; Ordinate: Aufnahme von ^{3}H-Isoproterenol in das Gewebe in ml · g^{-1} (korrigiert für die extrazelluläre Aminverteilung). Abszisse: Inkubationsdauer (min). Entsprechend dem Versuchsprotokoll, das in der Legende zur Abb. 3 wiedergegeben ist, wurden in gepaarten Versuchen Gewebsproben entweder in normaler Krebs' Lösung inkubiert (K^+-Konzentration: 5.9 mM) oder einer Krebs' Lösung ausgesetzt, deren NaCl (118mM) durch KCl ersetzt wurde (K^+-Konzentration:123.9 mM). Gezeigt sind Mittelwerte $\pm S_{\bar{x}}$ aus 9 (Kontrollen), bzw. 4 (hohe K^+-Konzentration) Versuchen.

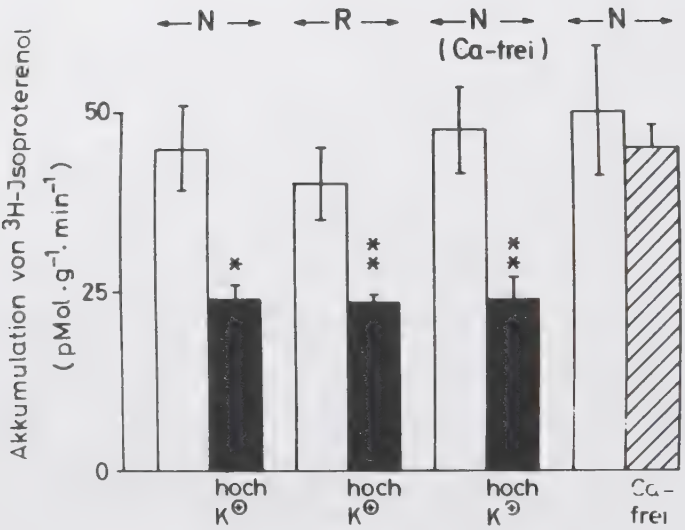

Abb. 7

Der Einfluß depolarisierender K^+-Konzentrationen auf die Aufnahme von ^{3}H-Isoproterenol unter verschiedenen experimentellen Bedingungen. Submandibulardrüse der Ratte; 37°C. Höhe der Säulen: Aufnahme von ^{3}H-Isoproterenol am Ende einer 1-min Inkubation in nMol · g^{-1} · min^{-1} (korrigiert für die extrazelluläre Aminverteilung). Gewebsproben von unbehandelten (N) oder von mit Reserpin vorbehandelten Tieren (R) wurden für 1 min mit o.2 µM ^{3}H-Isoproterenol inkubiert, und zwar entweder in normaler Krebs' Lösung (weiße Säule) oder in einer Krebs' Lösung, in der 118 mM NaCl durch 118 mM KCl ersetzt wurden (Endkonzentration für K^+: 123.5 mM; schwarze Säulen). Eine dieser Versuchsgruppen wurde mit Ca-freier Krebs' Lösung (Ca-frei) durchgeführt, die außerdem 1 mM

zustande kommt, muß deshalb verworfen werden. Abb. 7 zeigt außerdem, daß die Aufnahme von ^{3}H-Isoproterenol in der Ca^{++}-freien Lösung genauso gut funktionierte wie in normaler Krebs' Lösung.

4) Sättigungskinetik der initialen Aufnahme von ^{3}H-Isoproterenol

Um die Sättigungskinetik der Aufnahme von ^{3}H-Isoproterenol studieren zu können, mußten initiale Aufnahmegeschwindigkeiten bei verschiedenen Aminkonzentrationen gemessen werden. Zu diesem Zweck wurden Paare von Gewebsproben einer Drüse für o.75 bzw. 1.5 min mit der gleichen Aminkonzentration inkubiert und aus der Aufnahme beider Gewebsproben, die Aufnahmegeschwindigkeit (in $nMol \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$) berechnet. Wenn die Aufnahmegeschwindigkeit gegen die Aminkonzentration im Inkubationsbad aufgetragen wurde (Abb. 8) ergab sich eine hyperbolische Beziehung, d.h. die initiale Aufnahme von ^{3}H-Isoproterenol ließ sich mit steigenden Substratkonzentrationen sättigen. Demzufolge bestand eine lineare Korrelation zwischen der reziproken Aufnahmegeschwindigkeit und der reziproken Substratkonzentration im Inkubationsbad (Nebenbild in Abb. 8).

EGTA enthielten. In dem rechts außen gezeigten Säulenpaar wurde untersucht, ob Ca-freie Krebs' Lösung per se die Aufnahme von ^{3}H-Isoproterenol beeinflußt. Gezeigt sind Mittelwerte $\pm S_{\bar{x}}$ aus jeweils 5 gepaarten Versuchen. Die Sternchen zeigen signifikante Unterschiede zur Kontrolle (gepaarter t-Test): $*P < o.o5$; $**P < o.o1$.

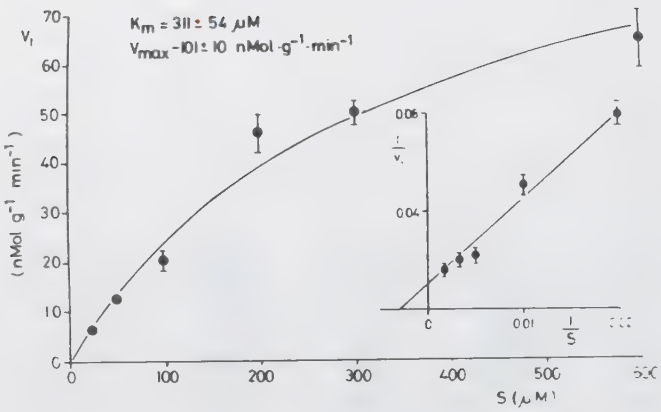

Abb. 8

Sättigungskinetik der Aufnahme von ^{3}H- Isoproterenol in Gewebsproben von Submandibulardrüsen der Ratte; Krebs' Lösung; 37°C. Ordinate: v_i = initiale Aufnahmegeschwindigkeit für ^{3}H-Isoproterenol (nMol · g^{-1} · min^{-1}). Abszisse: S = Konzentration von ^{3}H-Isoproterenol im Inkubationsbad (µM). Die initiale Aufnahmegeschwindigkeit wurde bestimmt, wie in der Methode beschrieben (sie ist korrigiert für die extrazelluläre Aminverteilung). Gezeigt sind Mittelwerte $\pm S_{\bar{x}}$ aus jeweils 10 Versuchen. K_m und V_{max} ($\pm S_{\bar{x}}$) wurden nach einer Methode von Wilkinson (1961) berechnet. Die eingezeichnete hyperbolische Kurve wurde aus der Michaelis-Menten Gleichung (unter Berücksichtigung der angegebenen sättigungskinetischen Konstanten) berechnet. Das Nebenbild gibt die doppeltreziproke Auftragung (Lineweaver und Burk, 1934) der gezeigten Ergebnisse wieder.

Eine Analyse dieser Ergebnisse mit der von Wilkinson (1961) beschriebene Methode (siehe Methodik) ergab eine maximale Transportgeschwindigkeit (V_{max}) von 101 μMol $\cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$ und eine Halbsättigungskonstante (K_m; definiert als diejenige Substratkonzentration, bei der die Aufnahmegeschwindigkeit $V_{max}/2$ beträgt) von 311 μM. Es ist interessant festzuhalten, daß die aus der Literatur bekannten sättigungskinetischen Konstanten für die extraneuronale Aufnahme von Noradrenalin in das perfundierte Rattenherz oder in glatte Muskelzellen alle in der gleichen Größenordnung liegen (siehe Diskussion) wie die hier für die Speicheldrüse der Ratte ermittelten Konstanten. Die Sättigungsfähigkeit der Aufnahme von Isoproterenol deutet auf einen Carrier-vermittelten Membrantransport für Isoproterenol im Drüsengewebe. Diese Aufnahme wird gestützt durch Befunde von Almgren und Jonason (1975), die zeigten, daß die Aufnahme von ^{3}H-Noradrenalin in die Spreicheldrüse der Ratte stark temperaturabhängig ist und ohne O_2 und Glucose im Inkubationsbad nicht funktioniert.

Wie bereits im Abschnitt 2 der Ergebnisse beschrieben, hemmen typische Hemmstoffe der extraneuronalen Aufnahme (Corticosteron, Phenoxybenzamin) auch die Aufnahme von ^{3}H-Isoproterenol. Da es sich offensichtlich um einen sättigungsfähigen Aufnahmeprozess handelt, war es wichtig zu erfahren, auf welchen Mechanismus diese Aufnahmehemmung zurückgeht: auf einen kompetitiven, oder einen nicht-kompetitiven Mechanismus der Hemmung. Wir haben deshalb den Typ der Hemmung für Corticosteron untersucht und haben in diese Untersuchung einen weiteren Hemmstoff der extraneuronalen Aufnahme, näm-

lich das Normetanephrin (Iversen,1965), einbezogen. In gepaarten Versuchen wurden initiale Aufnahmegeschwindigkeiten bei verschiedenen ^{3}H-Isoproterenol-Konzentrationen in Abwesenheit oder in Gegenwart von 3o µM eines dieser Hemmstoffe gemessen. Die Ergebnisse wurden nach der Methode von Hunter und Downs(1945) analysiert (Abb. 9 und 1o). Die in Abb. 9 und 1o gezeigten linearen Beziehungen zwischen y und x sind nach Hunter und Downs (1945) der experimentelle Beweis dafür, daß Corticosteron und Normetanephrin die Aufnahme von ^{3}H-Isoproterenol kompetitiv hemmen, d.h. die Affinität des Transportcarriers für das Substrat vermindern (und mithin den K_m von Isoproterenol erhöhen), ohne die V_{max} zu verändern. Im Falle einer nicht-kompetitiven Hemmung würde man in der Abb. 9 und 1o gezeigten Auftragung horizontale, zur x-Achse parallele Geraden erwarten. Die hoch-signifikante Korrelation zwischen y und x in Abb. 9 und 1o spricht also für einen kompetitiven Hemmtyp, wobei dann die Regressionsgerade (allgemeine Gleichung: $y = a + bx$; a = Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate; b = Steigung der Geraden) durch die folgende Gleichung beschrieben werden kann (Hunter und Downs, 1945):

$$y = K_i + \frac{K_i}{K_m} x$$

(wobei K_i = Inhibitor- oder Affinitätskonstante des Hemmstoffes und K_m = Halbsättigungskonstante des Substrats). Daraus ergibt sich, daß nach Berechnung der Konstanten a und b der Regressionsgeraden K_i ($K_i = a$) und K_m ($K_m = a/b$) ermittelt werden können. Der K_i von Corticosteron betrug

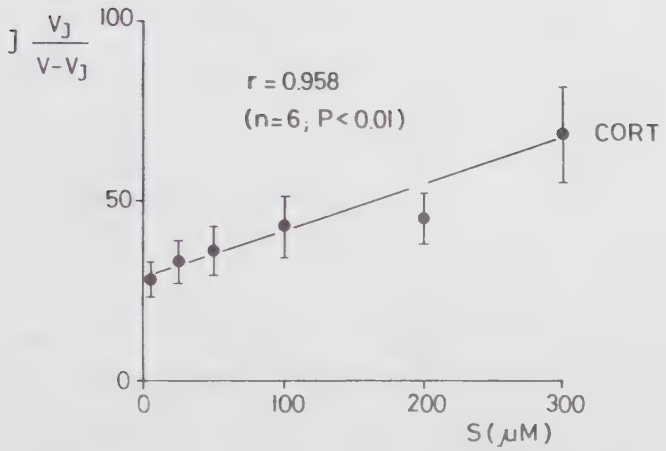

Abb. 9

Hunter-Downs Analyse der Hemmwirkung von Corticosteron (CORT) auf die Aufnahme von ^{3}H-Isoproterenol; Gewebsproben von Submandibulardrüsen der Ratte; Krebs' Lösung; 37°C Ordinate: $Iv_I/v-v_I$ (wobei I = Konzentration von Corticosteron, v = initiale Aufnahmegeschwindigkeit für ^{3}H-Isoproterenol in Abwesenheit und v_I = in Gegenwart von Corticosteron). Abszisse: S = Konzentration von ^{3}H-Isoproterenol im Inkubationsbad (µM). In gepaarten Versuchsansätzen wurden initiale Aufnahmegeschwindigkeiten für ^{3}H-Isoproterenol (siehe Methodik) sowohl in Abwesenheit als auch in Gegenwart von 3o µM Corticosteron bestimmt. Die Aminkonzentrationen im Inkubationsmedium lagen zwischen 5 und 3oo µM. Die extrazelluläre Aminverteilung im Gewebe (^{14}C-Sorbit-

29 µM, der von Normetanephrin 6o µM. Der K_m von Isoproterenol betrug in der Versuchsgruppe, in der Corticosteron getestet wurde 242 µM und in der Versuchsgruppe mit Normetanephrin 215 µM. Diese K_m-Werte stimmen recht gut mit dem aus den Ergebnissen der Abb. 8 errechneten K_m-Wert (311 µM) überein. Die K_i-Werte von Corticosteron und Normetanephrin sind deutlich niedriger als der K_m von Isoproterenol. Demnach ist die Affinität beider Hemmstoffe zum Transportcarrier größer als die des Substrats Isoproterenol.
Die Hemmung der Aufnahme von ^{3}H-Isoproterenol durch Corticosteron und Normetanephrin wurde auch mit Hilfe der von Lineweaver und Burk (1934) beschriebenen Methode kinetisch analysiert. Auch mit dieser Methode zeigte sich, daß Corticosteron und Normetanephrin die Aufnahme von ^{3}H-Isoproterenol kompetitiv hemmen. Die nach Lineweaver und Burk (1934) ermittelten K_i-Werte (24 µM für Corticosteron und 4o µM für Normetanephrin) unterschieden sich nur wenig von den nach der Methode von Hunter und Downs (1945) errechneten Werte.

Raum des Gewebes) wurde von der Aminaufnahme subtrahiert. Gezeigt sind Mittelwerte $\pm S_{\bar{x}}$ aus jeweils 5 Versuchen. Die eingezeichnete Regressionsgerade ($y=a+bx$; $a=K_i$; $b=K_i/K_m$) wurde aus den Mittelwerten berechnet und lautet: $y=29 \pm 0.12x$. Nach Hunter und Downs (1945) weist die lineare Korrelation zwischen $Iv_I/(v-v_I)$ und S auf einen kompetitiven Typ der Hemmung der Aufnahme durch Corticosteron hin; die Inhibitorkonstante (K_i) ergibt sich aus dem Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate (K_i = 29 µM).

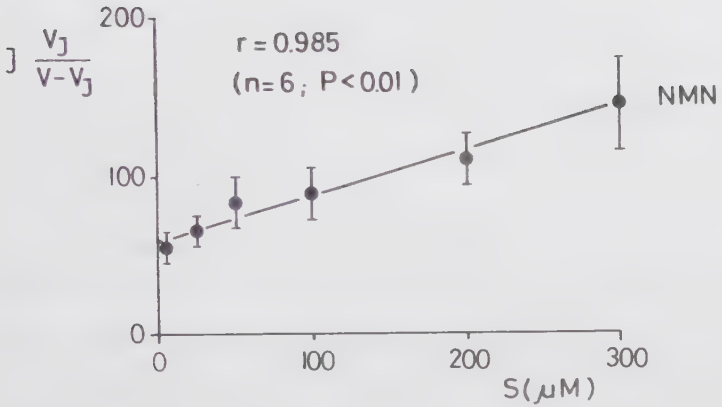

Abb. 1o

Hunter-Downs Analyse der Hemmwirkung von Normetanephrin (NMN) auf die Aufnahme von ^{3}H-Isoproterenol; Gewebsproben von Submandibulardrüsen der Ratte; Krebs' Lösung; 37°C. Ordinate: $Iv_I/v-v_I$. Abszisse = S(µM). Die Konzentration von Normetanephrin, die hier untersucht wurde, betrug 3o µM. Für weitere Erklärungen siehe Legende zur Abb. 9. Gezeigt sind Mittelwerte $\pm S_{\bar{x}}$ aus jeweils 5 Versuchen. Die eingezeichnete Regressionsgerade (y= a+bx) lautet: y = 6o + o.28x. Die Inhibitorkonstante (K_i) von Normetanephrin betrug 6o µM.

D. Diskussion

Aus in-vitro Untersuchungen, in denen Gewebsscheibchen von Speicheldrüsen oder Tränendrüsen in physiologischen Salzlösungen inkubiert wurden, ist bekannt, daß das Drüsengewebe unter diesen Bedingungen über lange Zeit physiologisch stabil und funktionstüchtig bleibt. So haben z.B. Leslie et al., (1976) und Parod und Putney (1978) gezeigt, daß der O_2-Verbrauch, der Wassergehalt und der Kationengehalt (Na, K, Ca, Mg) der Gewebsproben unter derartigen Versuchsbedingungen für zwei Stunden nahezu konstant bleiben. Auch die Wirkung von Agonisten und Antagonisten der α- und ß-Adrenoceptoren wurde von vielen Autoren unter solchen in-vitro Versuchsbedingungen untersucht (z.B. Batzri und Selinger, 1973; Batzri et al.,1973). In der vorliegenden Arbeit wurde die Aufnahme von ^{3}H-Isoproterenol in inkubierte Gewebsscheibchen der Submandibulardrüse der Ratte studiert. Gerade für solche Aufnahmestudien sind in-vitro Untersuchungen Versuchen in-vivo vorzuziehen, denn die Versuchsbedingungen können in in-vitro Versuchen wesentlich besser standartisiert werden, als in in-vivo Versuchen (Iversen,1967). Von der Dauer der Inkubation abhängige, wesentliche Veränderungen des Funktionszustandes des Drüsengewebes sind nach den oben zitierten Befunden aus der Literatur nicht zu erwarten.

Eine Aufnahme von Catecholaminen in extraneuronale Strukturen der Submandibulardrüse der Ratte wurde erstmals von Andén et al. (1963) beschrieben und später von Fischer et al. (1965) bestätigt. Bei diesen extraneuronalen Strukturen handelte es sich vor allem um Drüsenzellen (Acinus- und Ductus-

Zellen) wie histochemische Untersuchungen von Hamberger et. al (1967) gezeigt haben. Auch die Befunde von Almgren und Jonason (1971) sprechen dafür, daß für die extraneuronale Aufnahme hauptsächlich der parenchymatöse Anteil des Drüsengewebes verantwortlich ist. Diese Autoren haben den Hauptausführungsgang der Submandibulardrüse unterbunden, wodurch es zur Atrophie des Drüsengewebes kam. In solchen Drüsen, in denen das parenchymale Gewebe weitgehend verschwunden ist, war eine extraneuronale Aufnahme von ^{3}H-Noradrenalin kaum noch nachweisbar. Spätere Untersuchungen von Almgren und Jonason (1975, 1976) haben gezeigt, daß gewisse Eigenschaften (z.B. Substratspezifität, Empfindlichkeit gegenüber Hemmstoffen) der extraneuronalen Aufnahme in Geweben mesenchymaler Herkunft (Herzmuskelgewebe: Iversen, 1967; glatte Muskulatur der Gefäße: Gillespie, 1976) auch für die glanduläre Aufnahme von Catecholaminen Gültigkeit haben.

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel die extraneuronale Aufnahme eines Catecholamins in der Speicheldrüse der Ratte kinetisch zu charakterisieren. Als Modell-Amin wurde ^{3}H-Isoproterenol verwendet. Dieses Catecholamin ist ein gutes Substrat für die extraneuronale Aufnahme (Calligham und Burgen, 1966; Bönisch und Trendelenburg, 1974) und wird in adrenerge Nervenenden praktisch nicht aufgenommen (Hertting 1964; Andén et al., 1964). Es erübrigte sich deshalb, die neuronale Aufnahme durch entsprechende Hemmstoffe zu blokkieren. Iversen (1965) berichtete in seiner Arbeit, in der er die extraneuronale Aufnahme von Noradrenalin in das perfundierte Rattenherz erstmals beschrieb, daß eine extraneuronale

Akkumulation von Noradrenalin erst nach überschreiten einer gewissen Schwellenkonzentration des Noradrenalins in der Perfusionsflüssigkeit nachweisbar ist. Heute weiß man, daß dieses "Schwellenphänomen" ein Kunstprodukt war, denn bei niedrigen Aminkonzentrationen wird der größte Teil des extraneuronal aufgenommenen Amins metabolisiert (Lightman und Iversen, 1969; Fiebig und Trendelenburg, 1978 b). Das gleiche "Schwellenphänomen" hat Bönisch (1978) auch für Isoproterenol als Substrat beschrieben. Es ist demnach zur Bestimmung der extraneuronalen Aufnahme von Catecholaminen unumgänglich, neben der Akkumulation des unveränderten Amins im Gewebe, auch die gebildeten Aminmetaboliten zu messen, da beide in Frage kommende metabolisierenden Enzyme, die COMT und die Monoaminoxydase (MAO), intrazellulär (d.h. der Aufnahme nachgeschaltet) lokalisiert sind. Die Bestimmung der Aminmetaboliten sollte stets die Analyse des Inkubations-(oder Perfusions-)-mediums einschließen, denn einige Metabolite werden wegen ihrer guten Lipidlöslichkeit rasch aus dem Gewebe ausgewaschen (Fiebig und Trendelenburg, 1978 a; Henseling et al., 1978). Da die extraneuronale Aufnahme in der Speicheldrüse kinetisch charakterisiert werden sollte, mußte die zelluläre Aufnahme von ^{3}H-Isoproterenol mit möglichst geringem experimentellen Fehler bestimmt werden. Deshalb wurde in den hier beschriebenen Versuchen die Aminmetabolisierung gehemmt. Die Verwendung von Isoproterenol hat den großen zusätzlichen Vorteil, daß dieses Amin von der MAO nicht abgebaut wird (Hertting, 1964; Bönisch und Trendelenburg, 1974). Deshalb enthielt das Inkubationsmedium nur einen Hemmstoff der COMT.

Der hier verwendete Hemmstoff der COMT, U-o521 (Giles und Miller, 1967), hat in der Speicheldrüse bei der verwendeten Konzentration (1oo µM) keinen Einfluß auf die Aufnahme von Isoproterenol(Major et al., 1978). Unter diesen Versuchsbedingungen konnte die Akkumulation von Radioaktivität (^{3}H) im Gewebe als Maß für die extraneuronale Aufnahme von Isoproterenol angesehen werden. Die Kinetik der Aufnahme und Verteilung von Isoproterenol in der Speicheldrüse der Ratte weist viele Parallelen zu den kinetischen Befunden auf, die für die Aufnahme von Isoproterenol im perfundierten Rattenherz von Bönisch und Mitarbeitern erhoben wurden (Bönisch und Trendelenburg, 1974; Bönisch et al., 1974; Bönisch, 1978). Im Folgenden sollen deshalb die vorliegenden experimentellen Beobachtungen mit denen verglichen werden, die am Rattenherz gemacht wurden. Versuche, in denen der Efflux von ^{3}H-Isoproterenol aus Herzen gemessen wurde, die vorher mit diesem Amin aufgeladen worden waren, haben ergeben (Bönisch et al., 1974), daß sich Isoproterenol in zwei unterschiedlich schnell auswaschbaren, extraneuronalen Kompartimenten des Herzgewebes verteilt. Eines dieser Kompartimente ließ sich mit einer Halbwertzeit von 1o min, das andere mit einer Halbwertzeit von 25 min auswaschen. Die Analyse des Zeitverlaufes der Isoproterenolaufnahme in der Speicheldrüse hat ebenfalls zwei zelluläre Verteilungsräume für Isoproterenol ergeben. In Bezug auf die Aminverteilung verhalten sich demnach beide Gewebe (zumindest qualitativ) sehr ähnlich. Ein detaillierter Vergleich der die Kompartimente charakterisierenden Konstanten(Halbwertzeit, Kompartimentgröße) erscheint aus verschiedenen Gründen nicht

sinnvoll, denn am Herzen wurde die Kinetik des Aminausstroms untersucht, während in der vorliegenden Arbeit die Kinetik des Amineinstroms analysiert wurde. Wichtig ist es aber festzustellen, daß die Aufnahme und Verteilung von Isoproterenol in beide Kompartimente sowohl im Herzen als auch in der Speicheldrüse durch Hemmstoffe der extraneuronalen Aufnahme beeinträchtigt wurde. In beiden Geweben ließ sich die initiale Isoproterenolaufnahme mit steigender Substratkonzentration sättigen, d.h. die initiale Aufnahme des Amins als Funktion der Substratkonzentration gehorchte der Michaelis-Menten Gleichung. Es ist deshalb gerechtfertigt anzunehmen, daß es sich bei der Aufnahme von Isoproterenol in beide Gewebe um einen Carrier-vermittelten Membrantransportprozess handelt. Dafür spricht auch die Beobachtung, daß die Aufnahme von Isoproterenol in das Rattenherz (Bönisch et al., 1979) und die Rattenspeicheldrüse (Almgren und Jonason, 1975) stark temperaturabhängig ist. Die sättigungs-kinetischen Konstanten der glandulären Aminaufnahme (K_m = 311 µM; V_{max} = 1o1 nMol · g^{-1} · min^{-1}) liegen im gleichen Größenordnungsbereich wie die, die von Bönisch (1978) am Herzen ermittelt worden sind (K_m = 11o µM; V_{max} = 8o nMol · g^{-1} · min^{-1}). Bei genauer Betrachtung dieser Konstanten fällt jedoch auf, daß das Verhältnis V_{max}/K_m um mehr als 2 größer ist als die Speicheldrüse (o.32 nMol · g^{-1} · min^{-1} · μM^{-1}). Dieser Quotient wird von einigen Autoren (z.B. Christensen und Handlogten, 1977) als wichtigstes Maß für die Aktivität eines Membrantransportprozesses angesehen, da er als eine Art Geschwindigkeitskonstante die Transportgeschwindigkeit bei sehr niedrigen Substratkonzentrationen

bestimmt. Diese Feststellung ergibt sich aus der Tatsache, daß sich die Michaelis-Menten Gleichung (siehe Methodik) bei relativ niedrigen Substratkonzentrationen (wenn $S \ll K_m$) zu folgender Gleichung vereinfacht:

$$v_i = \frac{V_{max}}{K_m} \cdot S$$

Der Unterschied zwischen dem Herzen und der Speicheldrüse bezüglich des Quotienten V_{max}/K_m liegt wahrscheinlich darin begründet, daß die Aufnahme von Isoproterenol im Herzen am perfundierten Organ gemessen wurde, während im Falle der Speicheldrüse Gewebsproben inkubiert wurden. Da die Diffusionswege im inkubierten Gewebe größer sind als im perfundierten Gewebe, können Diffusionsprobleme für diesen scheinbaren Organunterschied verantwortlich sein. Auf Grund theoretischer Überlegungen kam Green (1976) zu dem Schluß, daß bei enzymatischen Reaktionen, in denen der Zugang des Substrats zum Enzym durch Diffusion kontrolliert wird, der K_m des Substrats zunehmen muß, ohne daß sich die V_{max} ändert. Ein Vergleich der sättigungskinetischen Konstanten der Aufnahme von Isoproterenol zwischen Herz und Speicheldrüse zeigt in der Tat (siehe oben), daß der Hauptunterschied in den K_m-Werten liegt. Was diese Organunterschiede in den kinetischen Konstanten auch immer bedeuten mögen, erstaunlich ist die Tatsache, daß die Unterschiede relativ klein sind, obwohl ein Gewebe ektodermaler Herkunft hier einem Gewebe mesenchymaler Herkunft dort gegenübersteht. In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu betonen, daß die K_m-Werte für die extraneuronale Aufnahme von Noradrenalin

auch im Größenordnungsbereich von 10^{-4} M liegen, und zwar unabhängig davon, ob die Aminaufnahme mit Hilfe biochemischer Methoden oder quantitativ-histochemischer Methoden bestimmt wurde (Tabelle 1).

Nicht nur die Verteilungs- und Sättigungskinetik für die Aufnahme von Isoproterenol sind in der Speicheldrüse und im Herzen sehr ähnlich, sondern auch die Kinetik der Aufnahmehemmung durch Corticosteron. Bönisch (1978) hat gezeigt, daß Corticosteron die Aufnahme von Isoproterenol in das Rattenherz kompetitiv hemmt; der K_i-Wert von Corticosteron lag bei 1.2 µM.

Tabelle 1: Sättigungskinetische Konstanten für die extraneuronale Aufnahme von Noradrenalin (Zusammenstellung aus der Literatur)

Organ bzw. Gewebe	K_m (µM)	V_{max} nMol·g^{-1}·min^{-1}	Methode zur Bestimmung der Aminaufnahme	Literatur
perfundiertes Rattenherz	252	1o1	biochemisch	Iversen (1965)
perfundiertes Rattenherz	58-25o	48-53	biochemisch	Fiebig u. Trendelenburg (1978 b)
glatte Muskulatur (Kaninchenohrarterie)	49o	---	histochemisch	Gillespie u. Towart (1973)
glatte Muskelzellen in Kultur	262	---	biochemisch	Powis (1973)
glatte Muskulatur (Meerschweinchentrachea)	156	---	histochemisch	O'Donnel u. Saar (1978)

In der Speicheldrüse war Corticosteron ebenfalls ein kompetitiver Hemmstoff (s. Abb. 9); der K_i von Corticosteron (29 µM) war aber mehr als 2o mal höher als im Herzen. Dieser Unterschied in den K_i-Werten könnte auf einen "echten" Organunterschied hinsichtlich der Wirkungsstärke von Corticosteron zurückgehen, könnte aber auch (zumindest zum Teil) Diffusionsprobleme widerspiegeln, die bei inkubierten Gewebsproben sicherlich wesentlich gravierender sind, als im perfundierten Organ. Die zuletzt genannte Möglichkeit ergibt sich eindeutig aus den theoretischen Überlegungen von Green (1976; s. auch vorangegangen Absatz). Ein anderer Hemmstoff der extraneuronalen Aufnahme, der in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, war Normetanephrin. Auch diese Substanz hemmte die glanduläre Aufnahme von Isoproterenol kompetitiv. Einen kompetitiven Hemmtyp hat auch Powis (1973) für die Hemmung der Aufnahme von Noradrenalin durch Normetanephrin in glatten Muskelzellen (Gewebekultur) gefunden. Der kompetitive Mechanismus der Aufnahmehemmung läßt sich dahingehend interpretieren, daß Corticosteron und Normetanephrin an der Stelle des extraneuronalen Aufnahmecarriers gebunden werden, an der auch das Substrat gebunden und dann transportiert wird. Da in der Speicheldrüse der K_m von Isoproterenol deutlich höher war als die K_i-Werte von Corticosteron und Normetanephrin, ist außerdem die Annahme gerechtfertigt, daß beide Hemmstoffe mit höherer Affinität an den Carrier gebunden werden als das Substrat Isoproterenol.

Bezüglich der Effekte einer veränderten Ionenzusammensetzung der Inkubationslösung zeigen die Ergebnisse eindeutig, daß die Aufnahme von Isoproterenol in das Drüsengewebe von der

extrazellulären Na^+-Konzentration weitgehend unabhängig ist. Eine Erniedrigung der Na^+-Konzentration der Lösung von 143 auf 25 mM hatte keinen Einfluß auf den Isoproterenoltransport. Die Beobachtung von Gillespie und Towart (1973), daß die Akkumulation von Noradrenalin in der glatten Muskulatur der Ohrarterie des Kaninchens durch eine solche Veränderung der externen Na^+-Konzentration partiell gehemmt wurde, ist demnach für die Speicheldrüse nicht gültig. Die Befunde von Gillespie und Towart (1973) sollten aber auf keinen Fall dahingehend gedeutet werden, daß es sich bei der extraneuronalen Aufnahme in der glatten Muskulatur der Gefäße um einen "Na^+-abhängigen" Membrantransportprozess handelt, der wie für die neuronale Aufnahme von Aminen und Aminosäuren (Übersicht bei Iversen, 1975) und die enterale Resorption von Zuckern und Aminosäuren (Übersicht bei Schulz und Curran, 197o) beschrieben, durch den in die Zellen gerichteten Na^+-Gradienten aktiviert wird. Gillespie und Towart (1973) haben nämlich gefunden, daß die Aufnahmehemmung in der Na^+-armen Lösung durch die Anwesenheit von Li^+ (NaCl wurde dann nicht durch Saccharose, sondern durch LiCl ersetzt, um die Osmolarität der Lösung konstant zu halten) wieder aufgehoben werden kann. In den erwähnten "Na^+-abhängigen" Transportprozessen ist dagegen die aktivierende Wirkung von extrazellulärem Na^+ sehr spezifisch, d.h. der Transport kann durch kein anderes monovalentes Kation in vergleichbarer Weise stimuliert werden. Die hier besprochenen Versuche mit der Speicheldrüse und die Beobachtungen von Gillespie und Towart (1973) zeigen deshalb, daß die extraneuronale Aufnahme von Catecholaminen <u>nicht</u> zu den "Na^+-abhängigen" Transportpro-

zessen gerechnet werden kann.

Der Ersatz von 118 mM NaCl durch KCl hatte einen deutlichen hemmenden Einfluß auf die Aufnahme von Isoproterenol in das Drüsengewebe. Da depolarisierende K^+-Konzentrationen auch die Aufnahme von Noradrenalin in glatte Muskelzellen beeinträchtigen (Gillespie und Towart, 1973; Anning et al., 1978) ist der Schluß gerechtfertigt, daß dieser Befund generell für die extraneuronale Aufnahme Gültigkeit hat. Wenn man einmal von der Möglichkeit absieht, daß K^+ per se die extraneuronale Aufnahme hemmen, dann wäre der hemmende Einfluß hoher K^+-Konzentrationen ein Hinweis darauf, daß das Ruhemembranpotential der Zellen eine wichtige Rolle bei der extraneuronalen Aufnahme spielt. Es wäre z.B. nicht abwegig anzunehmen, daß der Carrier-Substrat-Komplex eine positiv Ladung trägt, da Catecholamine im physiologischen pH-Bereich hauptsächlich als Kation (Protonierte Amin-Funktion) vorliegen (Paton, 1976). Die elektrische Potentialdifferenz an der Zellmembran (intrazellulär negativ) könnte dann eine treibende Kraft für die Aminaufnahme darstellen. Das Ruhemembranpotential der Drüsenzellen von Speicheldrüsen liegt zwischen -4o und -7o mV und ist hauptsächtlich ein K^+-Diffusionspotential (Übersicht bei Petersen, 1976). Eine Erhöhung der externen K^+-Konzentrationen von 5.9 auf 123.9 mM sollte deshalb das Membranpotential der Drüsenzellen drastisch reduzieren.

Die Frage, ob die extraneuronale Aufnahme bei der Elimination des Noradrenalins aus der extrazellulären Flüssigkeit eine physiologisch wichtige Rolle spielt, ist noch nicht endgültig geklärt. Es ist bekannt, daß Hemmstoffe der

extraneuronalen Aufnahme (z.B. Corticosteroide) unter experimentellen Bedingungen, unter denen die neuronale Aufnahme als Eliminationsweg blockiert wurde, die Wirkung von exogenen Noradenalin potenzieren (d.h. die Dosiswirkungskurve für alpha- oder beta-Effekte von Noradrenalin nach links in niedrigere Konzentrationen verschieben). Dies wurde z.B. am Papillarmuskel der Katze (Kaumann, 1972), an der Nickhaut der Katze (Graefe und Trendelenburg, 1974), am Vorhof der Katze (Goldie, 1976), an der Ohrarterie des Kaninchens (Johnson und De la Lande, 1978) und nicht zuletzt an der Submandibularisdrüse der Ratte (Almgren und Jonason, 1973) beobachtet. Eine potenzierte Wirkung von Corticosteroiden gegenüber Noradrenalin läßt sich in spärlich innervierten Organen (z.B. in großen arteriellen Gefäßen, in denen nur die Adventitia innerviert ist) auch ohne Blockade der neuronalen Aufnahme nachweisen (Besse und Bass,1966; Kalsner, 1969 und 1974). Daraus läßt sich schließen, daß die extraneuronale Aufnahme in dünn innervierten Organen und Geweben eine funktionell wichtige Rolle spielen kann und daß die extraneuronale Aufnahme eventuell für die Inaktivierung zirkulierender Catecholamine im Gefäßbett bedeutsam ist. Zu dieser Schlußfolgerung muß man deshalb gelangen, weil am Rattenherzen, das mit 1 µM ^{3}H-Noradrenalin durchströmt wird, nach Erreichen einer konstant bleibenden Geschwindigkeit der Amin-Elimination aus dem Perfusionsmedium, etwa die Hälfte aller Aminmetaboliten extraneuronalen Ursprungs sind (Fiebig und Trendelenburg, 1978 a).

E. Zusammenfassung

1) Die Aufnahme und Verteilung von ^{3}H-Isoproterenol wurde unter in-vitro Bedingungen in der Submandibulardrüse der Ratte untersucht. Da die Metabolisierung des Amins (durch die COMT) blockiert wurde, konnte die Akkumulation von Radioaktivität (^{3}H) im Gewebe als Maß für die Aminaufnahme angesehen werden. Die gleichzeitige Bestimmung des Extrazellulärraums (mit ^{14}C-Sorbit) machte es möglich, die zellulär aufgenommene Aminmenge zu berechnen.

2) Der Zeitverlauf der Verteilung von Isoproterenol im Drüsengewebe zeigte, daß sich das zelluläre Verteilungsvolumen für das Amin biphasisch-exponentiell dem Verteilungsraum im Fließgleichgewicht (2.49 ml · g^{-1}) näherte. Dieser Befund wurde als Ausdruck einer Aminverteilung in mindestens 2 zelluläre Kompartimente gedeutet. Die kinetische Analyse ergab, das sich ein Verteilungsraum (2.o4 ml · g^{-1}) mit einer Halbwertszeit von 15.8 min equilibrierte, während der andere (o.45 ml · g^{-1}) mit einer Halbwertszeit von 2.4 min in ein Gleichgewicht kam.

3) Die Aufnahme von Isoproterenol in beide Kompartimente war durch Corticosteron oder Phenoxybenzamin hemmbar. Eine Erniedrigung der Na^{+}-Konzentration im Inkubationsmedium von 143 auf 25 mM (118 mM NaCl wurden durch 118 mM Tris-HCl ersetzt) hatte keinen Einfluß auf die Aminverteilung. Im Gegensatz dazu wurde die Aufnahme von Isoproterenol erheblich beeinträchtigt, wenn die K^{+}-Konzentration im Inkubationsmedium von 5.9 auf 123.9 mM (118 mM NaCl wurden durch 118 mM KCl ersetzt) erhöht wurde.

4) Die initiale Aufnahme von Isoproterenol ließ sich mit

steigenden Aminkonzentrationen sättigen. Die Sättigungskinetik war vom Typ der Michaelis-Menten-Kinetik (K_m = 311 µM; V_{max} = 1o1 nMol · g^{-1} · min^{-1}), ein Befund der für einen Carrier-vermittelten Membrantransport von Isoproterenol spricht.

5) Normetanephrin und Corticosteron erwiesen sich als kompetitive Hemmstoffe der initialen Aufnahme von Isoproterenol (K_i für Normetanephrin = 4o-6o µM; K_i für Corticosteron = 24 - 29 µM).

6) Die Ergebnisse zeigen, daß die Aufnahme von Isoproterenol in das Drüsengewebe der extraneuronalen Aufnahme von Catecholaminen (Uptake $_2$ von Iversen, 1965) entspricht, da sich bezüglich der sättigungskinetischen Konstanten, bezüglich der Empfindlichkeit gegenüber bestimmten Hemmstoffen, bezüglich des Hemmtyps der Inhibitoren Normetanephrin und Corticosteron, bezüglich des Fehlens einer klassischen Na^+-Abhängigkeit und bezüglich der Beeinflußbarkeit durch hohe K^+-Konzentrationen keine Unterschiede zwischen beiden zellulären Aufnahmeprozessen ergaben.

Literaturverzeichnis

ALMGREN, O.,JONASON, J.: Relative importance of neuronal and extraneuronal mechanisms for the uptake and retention of noradrenaline in different tissues of the rat. Naunyn-Schmiedeberg' s Arch. Pharmac. 270, 289-309 (1971)

ALMGREN, O.,JONASON, J.: The effect of corticosterone on extraneuronal amin uptake and effector response in rat salivary glands. J. Pharm. Pharmac. 25, 537-543 (1973)

ALMGREN, O.,JONASON, J.: Extraneuronal uptake and metabolism in rat salivary glands. In: Proceedings of the VIth International Congress of Pharmacology (J. Tuomisto and M.K. Paasonen, eds.), Vol. 2 (Neurotransmission), pp. 105-115, Helsinki 1975

ALMGREN, O.,JONASON, J.: Extraneuronal amine transport in glandular tissue. In: The mechanism of neuronal and extraneuronal transport of catecholamines (D.M. Paton,ed), pp. 299-311. New York: Raven Press 1976

ANDÉN, N.-E., CARLSSON, A., WALDECK, B.: Reserpine-resistent uptake mechanisms of noradrenaline in tissue. Life Sci. 2, 889-894 (1963)

ANDÉN, N.-E., CORRODI, H., ETTLES, M., GUSTAFSSON, E., PERSSON, H.: Selective uptake of some catecholamines by the isolated heart and its inhibition by cocaine and phenoxybenzamine. Acta Pharmacol. Toxicol. 21, 247-259 (1964)

ANNING, E. N., O'DONNELL, R. S., WANSTALL, J.C.: Extraneuronal accumulation of isoprenaline in guinea-pig trachea, atria and uterus: a histochemical and pharmacological study. Br. J. Pharmac. 62, 472 (1978)

BATZRI, S., SELINGER, Z.: Enzyme secretion mediated by the epinephrine beta-receptor in rat parotid slices. J. Biol. Chem. 248, 356-36o (1973)

BATZRI, S., SELINGER, Z., SCHRAMM, M., ROBINOVITCH, M.R.: Potassium release mediated by the epinephrine alpha-receptor in rat parotid slices. J. Biol. Chem. 248, 316-368, (1973)

BESSE, J.C., BASS, A.D.: Potentation by hydrocortison of responses to catecholamines in vascular smooth muscle. J. Pharmacol. Exp. Ther. 154, 224-238 (1966)

BÖNISCH, H.: Further studies on the extraneuronal uptake and metabolism of isoprenaline in the perfused rat heart. Naunyn-Schmiedeberg' s Arch. Pharmacol. 3o3, 121-131(1978)

BÖNISCH, H., TRENDELENBURG, U.: Extraneuronal removal, accumulation and O-methylation of isoprenaline in the perfused heart. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 283, 191-218 (1974)

BÖNISCH, H., UHLIG, W., TRENDELENBURG, U.: Analysis of the compartments involved in the extraneuronal storage and metabolism of isoprenaline in the perfused heart. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 283, 223-244, (1974)

BÖNISCH, H., UHLIG, W., TRENDELENBURG, U.: Temperature sensivity of the extraneuronal uptake and metabolism of isoprenaline in the perfused rat heart. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol 3o6, 229-239,(1979)

BRADING, A.F., JONES, A.W.: Distribution and kinetics of Co-EDTA in smooth muscle, and its use as an extracellular marker. J. Physiol. (London) 2oo, 387-4o1,(1969)

CALLINGHAM, B.A., BURGEN, A.S.V.: The uptake of isoprenaline and noradrenaline by the perfused rat heart. Mol. Pharmacol. 2, 37-42 (1966)

COHEN, S.R., STAMPLEMAN, P.F., LAJTHA, A.: The temperature-dependent compartmentation of the "extracellular space" in mouse brain slices as revealed by the markers: inulin, sucrose, D-mannitol, D-sorbitol and sulfate. Brain Res. 21, 419-434 (197o)

CHRISTENSEN, H.N., HANDLOGTEN, M.E.: Na^+/Li^+ selectivity in transport system A: effects of substrate structure. J. Membrane Biol. 37, 193-211 (1977)

EHINGER, B., SPORRONG, B.: Neuronal and extraneuronal localisation of noradrenaline in the rat heart after perfusion at high concentrations. Experientia (Basel) 24, 265-266 (1968)

FARNEBO, L.-O., MALMFORS, T.: Histochemical studies on the uptake of noradrenaline and alpha-methyl-noradrenaline in the perfused rat heart. Europ. J. Pharmacol. 5, 313-32o (1969)

FIEBIG, E.R., TRENDELENBURG, U.: The neuronal and extraneuronal uptake and metabolism of ^{3}H-(-)noradrenaline in the perfused rat heart. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 3o3, 21-35 (1978 a)

FIEBIG, E.R., TRENDELENBURG, U.: The kinetic constants for the extraneuronal uptake and metabolism of ^{3}H-(-)noradrenaline in the perfused rat heart. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 3o3, 37-45 (1978 b)

FISCHER, J.E., KOPIN, I.J., AXELROD, J.: Evidence for extraneuronal binding of norepinephrine. J. Pharmacol. Exp. Ther.

147, 181-185 (1965)

FISCHER, R.A.; Statistical methods for research workers (13th edition). Oliver and Boyd Ltd., Edinburgh (1958)

GILES, R.E., MILLER, J.W.: A comparsion of certain properties of catechol-O-methyl transferase to those of adrenergic beta receptors. J. Pharmacol. Exp. Ther. 156, 2o1-2o6 (1967)

GILLESPIE, J.S.: Extraneuronal uptake of catecholamines in smooth muscle and connective tissue. In: The mechanism of neuronal and extraneuronal transport of catecholamines (D.M. Paton, ed.), pp. 325-358. New York: Raven Press 1976

GILLESPIE, J.S., TOWART, R.: Uptake kinetics and ion requirements for extraneuronal uptake of noradrenaline by arterial smooth muscle and collagen. Br. J. Pharmac. 47, 556-567 (1973)

GOLDIE, R.G.: The effects of hydrocortisone on response to and extraneuronal uptake of (-)-isoprenaline in cat and guinea-pig atria. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 3, 225-233 (1976)

GRAEFE, K.-H., BÖNISCH, H., FIEBIG, R., TRENDELENBURG, U.: Extraneuronal uptake and metabolism of catecholamines in isolated perfused hearts. In: Proceedings of the VI. Intern. Congress of Pharmacol., J. Tuomisto and M.K. Paasonen, Herausgeber, Vol. 2 (Neurotransmission), Seite 117-13o, Helsinki 1975.

GRAEFE, K.-H., STEFANO, F.J.E., LANGER, S.Z.: Preferential metabolism of (-)-^{3}H-norepinephrine through the deaminated glykol in the rat vas deferens. Biochem. Pharmacol. 22, 1147-116o (1973)

GRAEFE, K.-H., TRENDELENBURG, U.: The effect of hydrocortisone on the sensivity of the isolated nictitating membrane to catecholamines. Relationship to extraneuronal uptake and metabolism. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 286, 1 - 48 (1974)

GREEN, A.L.: The kinetics of enzyme action and inhibition in intact tissue and tissue slices, with special reference to colinesterase. J. Pharm. Pharmac. 28, 265-274 (1976)

HAEUSLER, G., THOENEN, H., HAEFELY, W., HUERLIMANN, A.: Electrical events in cardiac adrenergic nerves and noradrenaline release from the heart induced by acetylcholine and KCl. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmac. u. exp. Path. 261, 389-411 (1968)

HAMBERGER, B., NORBERG, K.-A., OLSON, L.: Extraneuronal binding of catecholamines and 3,4-dihydrophenylalanine (dopa) in salivary glands. Acta physiol. scand. 69, 1-12 (1967)

HENSELING, M., GRAEFE, K.H., TRENDELENBURG, U.: The rate constants for the efflux of the metabolites of noradrenaline from rabbit aortic strips. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 302, 207-215 (1978)

HERTTING, G.: The fate of ^{3}H-isoproterenol in the rat. Biochem. Pharmacol. 13, 1119-1128 (1964)

HUNTER, A., DOWNS, C.E.: The inhibition of arginase by amino acids. J. biol. Chem. 157, 427-446 (1945)

IVERSEN, L.L.: The uptake of noradrenaline by the isolated perfused rat heart. Brit. J. Pharmacol. 21, 523-537 (1963)

IVERSEN, L.L.: The uptake of catecholamines at high perfusion concentrations in the rat isolated heart: a novel

catecholamine uptake process. Brit. J. Pharmacol. 25, 18 -33 (1965)

IVERSEN, L.L.: The uptake and storage of noradrenaline in sympathetic nerves. Cambridge Univ. Press, Cambridge 1967

IVERSEN, L.L.: Uptake processes for biogenic amines. In: Handbook of Psychopharmacology, L.L. Iversen, S.D. Iversen und S.H. Snyder (Herausgeber), Vol. 3, Seite 381-442, Plenum Press, New York und London 1975

IVERSEN, L.L., SALT, P.J.: Inhibition of catecholamine uptake$_2$ by steroids in the isolated rat heart. Brit. J. Pharmacol. 4o, 528-53o (197o)

JOHNSON, S.M., DE LA LANDE, I.S.: Action of deoxycorticosterone acetate on the central artery of the rabbit ear. Bood Vessels 15, 231-246 (1978)

KALSNER, S.: Mechanism of hydrocortisone potentation of responses to epinephrine and noradrenaline in rabbit aorta. Circ. Res. 24, 383-395 (1969)

KALSNER, S.: Sensitization of noradrenaline response by inhibition of extraneuronal uptake in a coronary artery preparation. Brit. J. Pharmac. 51, 453-455 (1974)

KAUMANN, A.J.: Potentation of the effects of isoprenaline and noradrenaline by hydrocortisone in cat heart muscle. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 273, 134-153 (1972)

KIRPEKAR, S.M., WAKADE, A.R.: Release of noradrenaline from the cat spleen by potassium. J. Physiol. (London) 194, 595-6o8 (1968)

LESLIE, B.A., PUTNEY, J.W., SHERMAN, J.M.: Alpha-adrenergic, beta-adrenergic and cholinergic mechanisms for amylase secretion by rat parotid gland in vitro. J. Physiol.

(London) 260, 351-370 (1976)

LIGHTMAN, S.L., IVERSEN, L.L.: The role of uptake$_2$ in the extraneuronal metabolism of catecholamines in the isolated rat heart. Br. J. Pharmacol. 37, 638-649 (1969)

LINEWEAVER, H., BURK, D.: The determination of enzyme dissociation constants. J. Amer. Chem. Soc. 56, 658-666 (1934)

MAJOR, H., SAUERWEIN, I. GRAEFE, K.H.: Kinetics of the uptake of ^{3}H-(±)isoprenaline in the rat submaxillary gland. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 305, 51-63 (1978)

MORGAN, H.E., HENDERSON, M.J., REGEN, D.M., PARK, C.R.: Regulation of glucose uptake in muscle. I. The effects of insulin and anoxia on glucose transport and phosphorylation in the isoleted, perfused heart of normal rats. J. Biol. Chem. 236, 253-261 (1961)

O'DONNELL, S.R., SAAR, N.: The uptake kinetics and metabolism of extraneuronal noradrenaline in guinea-pig trachea as studied with quantitative fluorescence microphotometry. Br. J. Pharmac. 62, 235-239 (1978)

PAROD, R.J., PUTNEY, J.W.: An alpha-adrenergic receptor mechanism controlling potassium permeability in the rat lacrimal gland acinar cell. J. Physiol. (London) 281, 359-369 (1978)

PATON, D.M.: Charakteristics of uptake of noradrenaline by adrenergic neurons. In: The mechanism of neural and extra-neuronal transport of catecholamines (Herausgeber: D.M. PAton), Seite 49-66, New York: Raven Press 1976

PETERSEN, O.H.: Elektrophysiology of mammalian gland cells. Physiol. Rev. 56, 535-577 (1976)

POWIS, G.: The accumulation and metabolism of (-)-noradrenaline by cells in culture. Br. J. Pharmac. 47, 568-575 (1973)

RIGGS, D.S.: The mathematical approach to physiological problems. The M.I.T. Press, Cambridge-Massachusetts-London, 1963

SCHULTZ, S.G., CURRAN, P.F.: Coupled transport of sodium and organis solutes. Physiol. Rev. 50, 637-718 (1970)

TRENDELENBURG, U., HENSELING, M.: Factors determining the rat of relaxation of rabbit aortic strips after an exposure to noradrenaline. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 293, 235-244 (1976)

WEBER, E.: Grundriss der biologischen Statistik. 6. Auflage, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1967

WILKINSON, G.N.: Statistical estimation in enzyme kinetics. Biochem. J. 80, 324-332 (1961)

WINNE, D.: Zur Auswertung von Versuchsergebnissen: Die Prüfung ob Kurven sich in ihrem Verlauf unterscheiden. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 250, 383-396 (1965)

Lebenslauf

Name	Horst, Friedrich, Major
2. April 1949	geboren in Ober Nauses, Odenwald
1955 - 1959	Besuch der Volksschule in Spachbrücken
1959 - 1968	Besuch der Justus Liebig Schule in Darmstadt, Abschluß mit Abitur
1968 - 1969	Wehrpflicht abgeleistet
197o - 1972	Studium Diplombiologie an der TH Darmstadt bis zum Vordiplom
1972 - 1976	Studium der Medizin an der Universität Würzburg
Ende 1976	Staatsexamen
1977	Medizinalassistentenzeit in Oberkirch/Baden
März 1978	Approbation zum Arzt
1978 bis jetzt	Assistenzarzt an der Frauenklinik d. Kreiskrankenhauses in Groß Umstadt

Major

Andreas Staudenraus Druckerei GmbH · Münzstraße 4 · 8700 Würzburg